Aus der Kinderklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. R. Bierich

UNTERSUCHUNGEN ZUM MUSTER DER GALLENSÄUREN-SULFATESTER IM DARMSAFT BEI SÄUGLINGEN UND KINDERN MIT MALABSORPTIONS- UND MALDIGESTIONS-SYNDROMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

HANS-DIRK WEISHORN
aus Naunhof

1984

Aus der Kinderklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. J. R. Bierich

UNTERSUCHUNGEN ZUM MUSTER DER GALLENSÄUREN-SULFATESTER IM DARMSAFT BEI SÄUGLINGEN UND KINDERN MIT MALABSORPTIONS- UND MALDIGESTIONS-SYNDROMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

HANS-DIRK WEISHORN
aus Naunhof

1984

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter: Professor Dr. K.H. Niessen
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E.H.Egberts

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Fragestellung	1
2.	Biochemische Grundlagen	3
2.1.	Überblick über den Stoffwechsel der Gallensäuren	3
2.2.	Grundsätzliches zur Chromatographie von Gallensäuren	10
3.	Methoden	13
3.1.	Untersuchte Personen	13
3.2.	Probengewinnung	13
3.3.	Geräte und Reagentien	14
3.3.1.	Geräte	14
3.3.2.	Reagentien	15
3.4.	Bestimmung des Musters der Gallensäurensulfate	16
3.4.1.	Trennungsschritte	16
3.4.2.	Innerer Standard	17
3.4.3.	Säulentrennung	20
3.4.4.	Solvolyse	21
3.4.5.	Hydrolyse	22
3.4.6.	Trennung der gekoppelten und freien Gallensäuren auf Dünnschichtchromatographie-Platten	27
3.4.7.	Auswertung der Chromatogramme	29
3.4.8.	Eichkurven	30
3.4.9.	Auswertung und Statistik	33
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Kontrollgruppe	36
4.2.	Vergleich der Gruppen der kranken Kinder mit den Kontrollgruppen	43
4.2.1.	Vorgehensweise	43
4.2.2.	Subtotale Zottenatrophie der Dünndarmschleimhaut	44

4.2.3.	Patienten mit "Kurzdarm-Syndrom"	47
4.2.4.	Exokrine Pankreasinsuffizienz	49
4.2.4.1.	Mukoviszidose (zystische Pankreasfibrose)	49
4.2.4.2.	Kinder mit exokriner Pankreasinsuffizienz ohne Mukoviszidose (EPI)	51
5.	Diskussion	55
5.1.	Auswertungsmethodik	55
5.2.	Gesunde Kinder	56
5.3.	Kranke Kinder	61
5.3.1.	Subtotale Zottenatrophie (Coe)	61
5.3.2.	Kinder nach ausgedehnten Darmresektionen (KD)	64
5.3.3.1.	Mukoviszidose (CF)	65
5.3.3.2.	Exokrine Pankreasinsuffizienz (EPI)	67
6.	Zusammenfassung	69
	Abkürzungen	70
	Literaturverzeichnis	71
	Tabellen	79

1. Einleitung und Fragestellung

Seit der Mitte der 60er Jahre gewannen die Gallensäuren immer mehr an Interesse, besonders auch im Hinblick auf ihre diagnostische und therapeutische Wertigkeit. Schon seit langem ist die durch hydro- und lipophile Gruppen hervorgerufene Detergentien-artige Wirkung (Micellenbildung) bekannt, die für einen effizienten Transport und die Resorption fettlöslicher Substanzen erforderlich ist. In den letzten Jahren fand man weitere wichtige Funktionen der Gallensäuren, die ihre Bedeutung im Stoffwechselgeschehen unterstreichen, wie beispielsweise die Aktivierung der Lipase und der Co-Lipase im Darm (19). Auch bei der Proteinverdauung wurde der aktivierende Einfluß der Gallensäuren auf die Enterokinase, die wiederum Trypsinogen aktiviert, erst in den letzten Jahren festgestellt (36).

Erst durch die Micellenbildung können auch fettlösliche Vitamine, wie Vitamin A, K und E vom Körper aufgenommen werden. Eine inadäquate Micellenbildung hat durch die Störung der intestinalen Passagezeit aber auch Einfluß auf die Resorption wasserlöslicher Bestandteile der Nahrung. Bei Steatorrhoe werden Fettsäuren mit Ca^{++} und Mg^{++} zu wasserunlöslichen Seifen und können nicht vom Körper aufgenommen werden. Auch für den Gallefluß, sowie die Ausscheidung von Phospholipiden und Cholesterol in das Darmlumen sind Gallensäuren unerläßlich (11, 33).

Bei näherer Beschäftigung mit den Gallensäuren fiel die Gruppe der Gallensäurensulfatester als bis dahin unbekannte Untergruppe auf. Zunächst vermutete man nur eine Entgiftungsfunktion der Sulfatierung, insbesondere der als aggressiv bekannten Lithocholsäure, deren Hepatotoxizität nachgewiesen werden konnte.

Mit dieser Arbeit soll das Muster der gekoppelten Gallensäurensulfate bei Kindern verschiedener Altersgruppen im Hinblick auf mögliche altersabhängige Verschiebungen untersucht werden. Im Duodenalsaft von gastroenterologisch gesunden Kindern, die als Kontrollgruppe zusammengefasst wurden, wurde das Muster der Gallensäurensulfatester erstellt. Mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe wurden die Muster von Kindern, die an verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen litten, verglichen.

2. Biochemische Grundlagen

2.1. Überblick über den Stoffwechsel der Gallensäuren

Gallensäuren werden in der Leber durch eine Anzahl enzymatischer Reaktionen aus Cholesterin gebildet (79). Menschen bilden zwei sogenannte primäre Gallensäuren: eine Trihydroxy-Gallensäure, die Cholsäure (3-alpha, 7-alpha, 12-alpha, Trihydroxy-5-beta-Cholsäure, CS) und eine Dihydroxy-Gallensäure, die Chenodesoxycholsäure (3-alpha, 7-alpha, Dihydroxy-5-beta-Cholsäure, CDC, Abb. 1).

Obwohl CS und CDC einen gemeinsamen Ursprung haben, können sie jedoch nicht durch Dehydroxylierung in Positon 12 ineinander übergeführt werden. Die Produktion von Gallensäuren im Körper wird durch Feedback-Mechanismen gesteuert. Ausschlaggebend dabei ist die 7-alpha-Hydroxylierung des Cholesterins, die eine mikrosomale Reaktion darstellt (56). Man vermutet, daß die Synthese der 7-alpha-Hydroxylase durch die Gallensäuren-Konzentration in den Hepatozyten gesteuert wird: Vermehrte Gallensäurenkonzentrationen führen zu verminderter Enzymproduktion und umgekehrt. Ein Großteil der gebildeten primären Gallensäuren wird vor der Ausscheidung in die Gallenwege zunächst mit Taurin, bzw. Glycin an der Carboxylgruppe konjugiert.

Bakterielle Enzyme sind zur Bildung von sekundären Gallensäuren notwendig: Nach der Ausscheidung der primären (gekoppelten) Gallensäuren in das Darmlumen findet eine bakterielle 7-alpha-Dehydroxylierung durch Anaerobier statt, die zur Darmflora gehören und über die notwendigen Enzyme verfügen (Abb. 2).

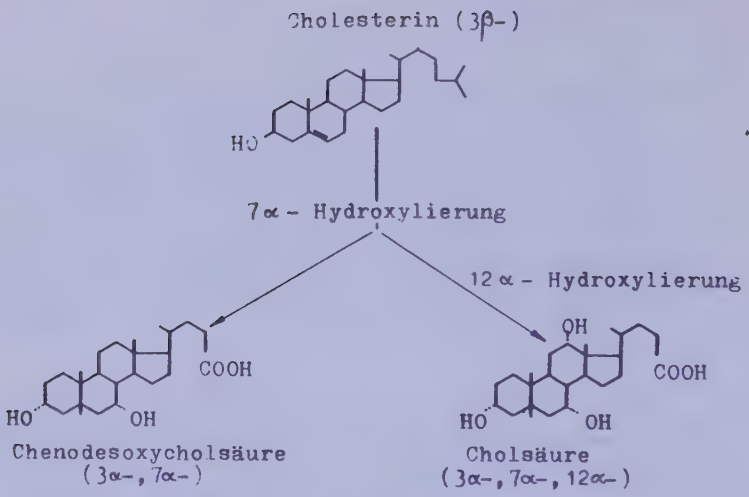


Abb. 1: Entstehung der primären Gallensäuren aus Cholesterin durch Hydroxylierung in 7α- Position, eine mikrosomale, begrenzende Reaktion. Die Epimerisierung der 3β - Bindung findet wahrscheinlich über eine Keto-Zwischenstufe statt.

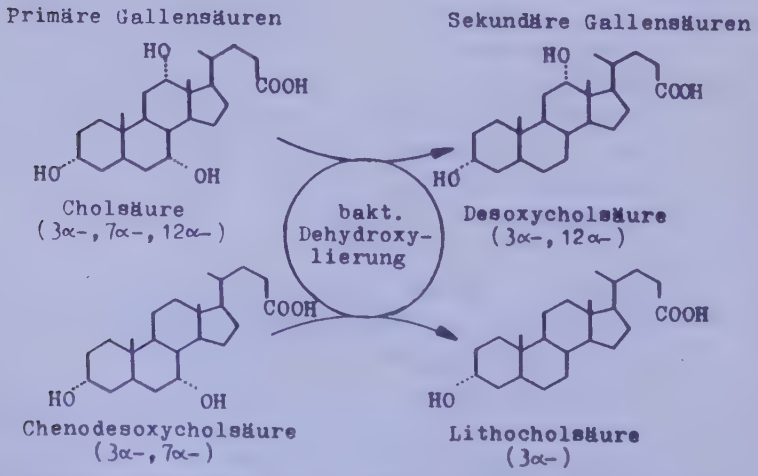


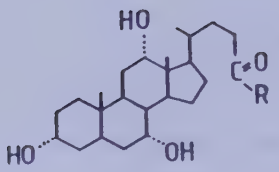
Abb. 2: Bildung sekundärer Gallensäuren durch bakterielle Dehydroxylierung der primären Gallensäuren in Position 7.

Eine andere als die 7-alpha-Dehydroxylierung scheint beim Menschen nicht stattzufinden. Durch sie entstehen aus der Cholsäure (CS) die Desoxycholsäure (DC) und aus der Chenodesoxycholsäure (CDC) die Lithocholsäure (LC). Eine zweite vorkommende bakterielle Transformation ist die Dehydrogenierung, durch die ca. 30 sekundäre Gallensäuren gebildet werden können, die aber alle eine untergeordnete Rolle spielen.

Die so veränderten Gallensäuren werden fast vollständig aus dem Darm rückresorbiert und kehren als sekundäre bzw. freie Gallensäuren zur Leber zurück (67). Sie werden dort zu einem hohen Prozentsatz rekonjugiert. LC wird allerdings in der Leber fast vollständig konjugiert, sulfatiert, bzw. glucuronidiert und nahezu total ausgeschieden, da konjugierte Lithocholsäure-Sulfatester (LC-S) nur zum geringsten Teil reabsorbiert oder aber durch Bakterien-Enzyme gespalten und danach resorbiert wird (39). Der Pool der LC ist infolgedessen sehr klein (15, 31, 33, 65).

Gekoppelte Gallensäuren-Sulfate wurden bisher vor allem bei einer Cholestase im Serum, Urin und in geringerem Maß auch in den Faeces gefunden. Die renale Clearance für Gallensäuren-Sulfate liegt 15-fach höher als für die freien bzw. Taurin- oder Glycin-gekoppelten Gallensäuren (3, 11, 47, 52, 53, 72).

Die intestinale Reabsorption von Gallensäuren mit zwei polaren Gruppen ist erheblich erschwert gegenüber derselben Gallensäure mit nur einer polaren Gruppe. Taurolithocholsäure-Sulfatester (TLC-S) benötigt einen aktiven Transport zur Absorption und steht deshalb im distalen Ileum in Konkurrenz mit den übrigen, in höherer Konzentration vorhandenen primären konjugierten Gallensäuren (48). Möglicherweise stellt die erhöhte Veresterung mit Sulfat einen Versuch des Körpers dar, die



R_1 = -NH-CH_2-CH_2-SO_3H Tauro - Cholsäure

R_2 = -NH-CH_2-COOH Glyco - Cholsäure

Abb. 3: Konjugierte Gallensäure am Beispiel Cholsäure.

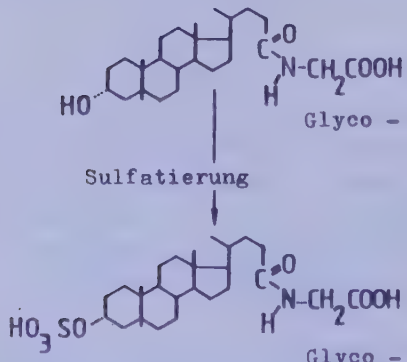


Abb. 4: Veresterung der Gallensäuren mit Schwefelsäure am Beispiel der Glyco - Lithocholsäure.

verminderte biliäre Exkretion zu kompensieren.

Durch die Reabsorption der Gallensäuren im Darm wird ein für den Körper sehr wichtiger Grundstoff im enterohepatischen Kreislauf (EHK) wieder der Nutzung zugeführt (biologisches Recycling). Vor der Wiederausscheidung durch die Galle werden Gallensäuren zum Teil durch Konjugation mit Taurin oder Glycin, Sulfatierung oder Glucuronidierung verändert, möglicherweise um damit lebertoxische freie Gallensäuren zu entgiften (46). Beim Erwachsenen beläuft sich der Gesamt-Pool an Gallensäuren auf ca. 2 bis 4 g, von denen 95 bis 99% wieder in den EHK aufgenommen werden. Der Pool zirkuliert nach einer Mahlzeit ungefähr zweimal. So werden im Laufe eines Tages ca. 26 g Gallensäuren in der Galle ausgeschieden (33, 55, 57, 79). Der Verlust durch die Faeces beträgt täglich ca. 200 bis 600 mg und wird im steady-state durch Synthese von Gallensäuren in der Leber ausgeglichen (56).

Es konnte durch in-vivo-Versuche gezeigt werden, daß es im Ileum einen aktiven Transport von Gallensäuren gibt. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß Dihydroxy-Gallensäuren (DC, CDC) weniger effizient als die Trihydroxygallensäure (CS) und die Taurin-konjugierten schneller als die Glycin-konjugierten resorbiert werden (23).

Auch passive Absorption wurde nachgewiesen. Sie ist abhängig vom pH des Darminhaltes, von der Dissoziationskonstanten der verschiedenen Gallensäuren und der kritischen micellaren Konzentration der Gallensäuren, die abhängig ist von der Temperatur, dem pH-Wert, der Konzentration des Kations und der Anwesenheit anderer Lipide (33, 67).

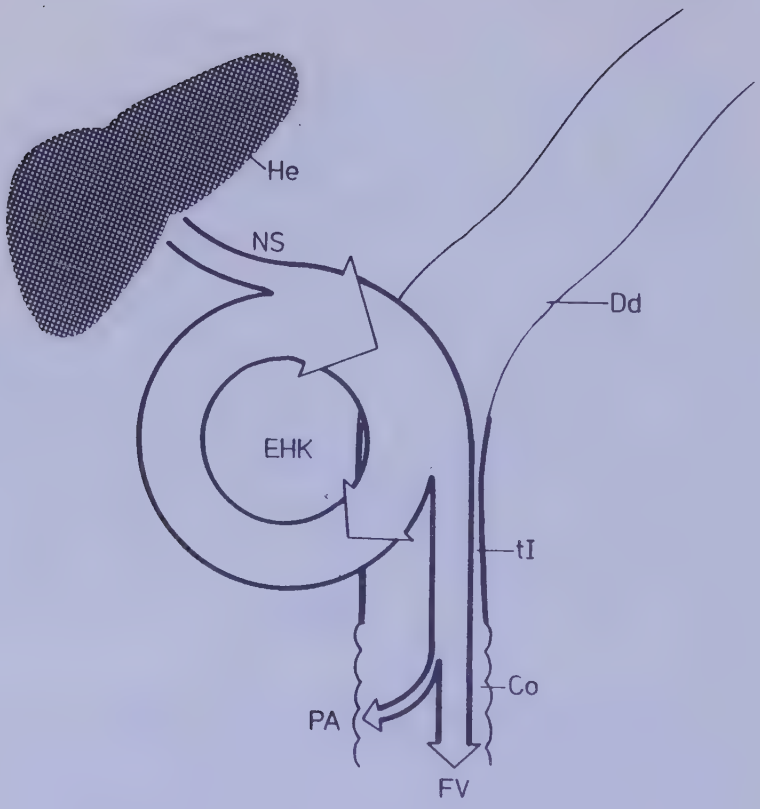


Abb. 5 : Schematische Darstellung des enterohepatischen Kreislaufs (EHK) mit der GS-Neusynthese (NS) der Leber (He), die im steady state den faekalen Verlusten (FV) entspricht. Der überwiegende Teil der GS-Rückresorption findet aktiv im terminalen Ileum (tI), zum Teil aber auch im Colon (Co) durch passive, nichtionische Diffusion (PA) statt. Dd - Dünndarm.

Freie Gallensäuren sind weniger starke Säuren als Glycin-konjugierte bzw. als Taurin-konjugierte Gallensäuren. Da die Diffusion nichtionischer Partikel durch Lipidmembranen 6 bis 7 mal schneller vonstatten geht als die geladener Moleküle, diffundieren nicht dissoziierte freie Gallensäuren besonders leicht aus dem Lumen. Taurin-gekoppelte Gallensäuren, die einen relativ niedrigen pK haben, können passiv nur sehr schlecht diffundieren und sind so auf den aktiven Transport bzw. ihre Dekonjugation angewiesen. Über das Ausmaß der passiven Absorption in bestimmten Darmabschnitten beim Menschen liegen bisher noch keine genauen Ergebnisse vor (21, 76). Im Blut werden die Gallensäuren, an Albumin gebunden, durch die Mesenterial- bzw. Portalvenen zur Leber transportiert, wo sie von Hepatozyten aufgenommen und "wiederaufbereitet" werden.

Nicht rückresorbierte Gallensäuren in höherer Konzentration, z. B. nach Ileum-Resektionen bei Erwachsenen, können zu Gallensäuren-induzierten Durchfällen führen, da es durch Gallensäuren in hohen Konzentrationen im Colon zur Wassersekretion durch Hemmung der Elektrolytabsorption kommt (22, 76).

2.2. Grundsätzliches zur Chromatographie von Gallensäuren

Die Eigenschaften von Molekülen, sich je nach der Anzahl und sterischen Ausrichtung ihrer polaren und unpolaren Gruppen mehr oder weniger stark an Oberflächen zu adsorbieren, wird bei chromatographischen Trennungsverfahren ausgenützt. Auf unterschiedliche Trägermedien, wie Glas oder Metall, können verschiedene Adsorbentien, z. B. Papier, Celluloseacetat, Kieselgel, Aluminiumoxid oder Hydroxylapatit aufgebracht werden. Je nach Beschaffenheit der Adsorbentien und Trägermedien, des Laufmittels und der Eigenschaften der untersuchten Stoffe kann man so auch Substanzen voneinander trennen, die in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr ähnlich reagieren.

In den vergangenen 20 Jahren rückten die Gallensäuren immer mehr in den Blickpunkt der Aufmerksamkeit. Durch verschiedene Methoden, z. B. radioaktive und enzymatische Nachweise, weiter der Dünnschicht-, Säulen- und Gas-Flüssigkeits-Chromatographie, zum Teil gekoppelt mit Massenspektrometrie, war es gelungen, Licht ins Dunkel der Cholesterin-Metaboliten und ihres Stoffwechsels zu bringen. Durch diese Erkenntnisse eröffneten sich auch Möglichkeiten der Therapie gastrointestinaler Erankungen wie etwa die Möglichkeit, Gallensteine mit Hilfe einer CDC-Behandlung aufzulösen.

Die Dünnschicht-Chromatographie mit Kieselgel als Adsorbens hat sich bei der Trennung freier und - in begrenztem Umfang - auch gekoppelter Gallensäuren als probate, nicht zu aufwendige Methode erwiesen. Auf konventionelle Art, d. h. durch Abkratzen des bestimmten, durch Dünnschicht-Chromatographie getrennten Gallensäure-Punktes vom Träger und fluorimetrische oder enzymatische Mengenbestimmung konnten dadurch noch Gallensäuremengen bis zu 1 µg nachgewiesen werden (5, 7).

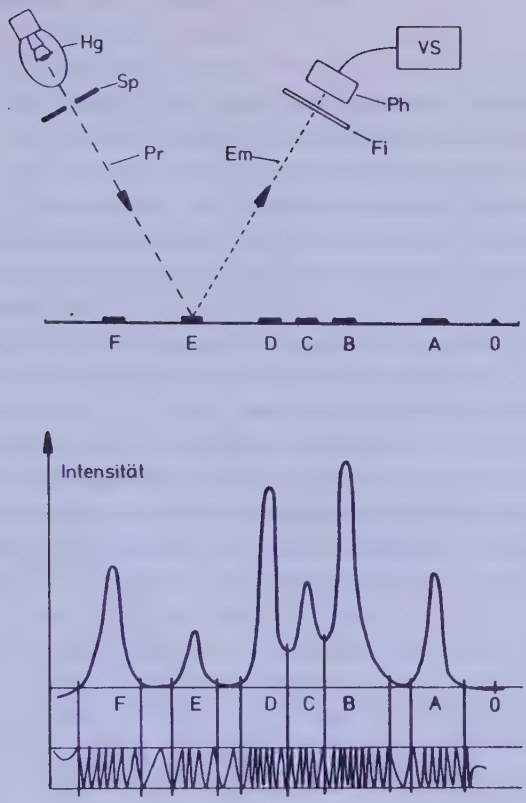


Abb. 6 : Schematischer Aufbau des Chromatogramm-Spektral-Photometers. Darstellung des Abtastvorgangs einer mit den Gallensäurenpunkten A,B,C... beladenen Dünnschicht-Chromatographie-Platte. Darunter die zugehörige, vom Schreiber ausgedruckte Fluoreszenz-Intensitätskurve mit Darstellung der Integrale über der Null-Linie.
O -Auftragepunkt des GS-Gemisches, A,B,C... - GS-Punkte auf DC-Platte, chromatographisch getrennt, Em - Emissionsstrahlung der angeregten GS-Punkte, Fi - Primärstrahlungsfilter, das Emissionsstrahlung durchlässt, Hg - Primärstrahlungsquelle, erzeugt monochromatische UV-Strahlung, Ph -Photozelle, Pr - Primärstrahlung, Sp - Spaltblende, VS - Verstärker und Schreiber (mit Integrator).

Gallensäuren haben die Eigenschaft nach einer Vorbehandlung, die "Aktivierung" oder auch "Entwicklung" genannt wird, bei Bestrahlung mit UV-Licht in Schwingungen zu geraten und bei einer Wellenlänge von 460 nm zu fluoreszieren. Unter Ausnutzung dieser Eigenschaft läßt sich die Nachweisgrenze für Gallensäuren noch um ca. eine Zehnerpotenz steigern, in dem man auf einer Dünnschicht-Chromatographie-Platte die Chromatogramm-Bande einer Gallensäurenlösung unter Bestrahlung mit monochromatischem UV-Licht kürzerer Wellenlänge (= 430 nm) abfährt und die dabei entstehende Fluoreszenzstrahlung als Indikator für Vorhandensein und Konzentration von Gallensäuren verwendet. Eine Fotozelle mißt die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Störungen aufgrund reflektierter Primärstrahlungen werden durch ein "Primärstrahlungsfilter" ausgeschlossen. Die Methode wurde erstmals durch Van Den Ende und Brühl und Schmidt beschrieben (10, 75).

3. Methoden

3.1. Untersuchte Personen

Im Laufe einer gastroenterologischen Untersuchung wurde bei mehr als 80 Kindern im Alter zwischen 2 Monaten und 15 Jahren ein Sekretin-Pankreozymin-Test durchgeführt, nachdem die Erziehungsberechtigten ihr Einverständnis erklärt hatten. Ein Großteil der Patienten kam wegen Gedeihstörung und einer deshalb vermuteten Verdauungsinsuffizienz zur Diagnosestellung und eventuellen Therapie-Einleitung in die Klinik. Bei 38 Kindern konnte - nach Durchführung der Untersuchung - eine gravierende gastroenterologische Erkrankung ausgeschlossen werden; sie dienten, in Altersstufen getrennt, bei unseren Untersuchungen als Kontrollgruppe. Bei 12 Patienten fand sich eine subtotale Zottenatrophie der Dünndarmschleimhaut, sie wurden zur Zöliakie-Gruppe zusammengefasst. Weitere Gruppen wurden gebildet durch

a) 9 Kinder, bei denen eine exokrine Pankreasinsuffizienz nachgewiesen werden konnte.

b) 7 Kinder, die an einer zystischen Pankreasfibrose (Mukoviszidose-Gruppe) leiden.

c) 4 Kinder mit Kurzdarm-Syndrom, die teilweise mehrfach untersucht wurden.

3.2. Probengewinnung

Das Untersuchungsmaterial wurde in der vorliegenden Arbeit durch einen Sekretin-Pankreozymin-Test nach der von Burton et al. angegebenen und von Niessen für die Anwendung bei Kindern weiterentwickelten Methode durchgeführt (13, 64, 68). Über eine doppelläufige Sonde, deren Spitze im Duodenum im Bereich der Pars horizontalis liegt, wird laufend Duodenalsaft aspiriert und in 10-Minuten-Fraktionen gesammelt. Über eine zweite Sonde, die im Fundusbereich liegen sollte, wurde eben-

falls permanent Magensaft in 10-Minuten-Fraktionen abgesaugt, um eine Verdünnung des Duodenalsaftes durch Magensaft zu vermeiden. Der aspirierte Darmsaft wurde unmittelbar nach der Entnahme in einem Salz-Eis-Bad bei -14° C bis -17° C eingefroren.

Bei der Durchführung des eigentlichen Testes wurde zunächst über 30 Minuten Nüchternsekret aspiriert, die erste 10-Minuten-Fraktion wurde verworfen und danach wurden 2 Einheiten/kg KG Sekretin (Boots) i.v. injiziert. Nach der Sammlung von drei weiteren 10-Minuten-Fraktionen wurden 2 E/kg KG Pankreozymin (Boots) injiziert und wiederum drei 10-Minuten-Fraktionen Duodenal- und Magensaft gesammelt. In der vorliegenden Arbeit wird das Muster der Gallensäuren-Sulfatester in der ersten 10-Minuten-Fraktion nach Injektion des Pankreozymins untersucht, da sich bei Voruntersuchungen herausgestellt hatte, daß die Gallensäuren in dieser Phase im Darmsaft am höchsten konzentriert sind (45).

Da Gallensäuren, wie Voruntersuchungen zeigten, bei tiefen Temperaturen sehr stabil sind, konnte der Duodenalsaft bei -30° C gelagert und bei Bedarf untersucht werden (60).

3.3. Geräte und Reagentien

3.3.1 Geräte

Zeiss Chromatogramm-Spektralphotometer KM 3 mit automatischer Nullpunkteinstellung und Verstärkung.
Servogor-Sb Potentiometerschreiber mit Integrator, Firma Metrawatt, Nürnberg.
Labofuge, Firma Heraeus-Christ, Osterode.
TLC-multi-spotter, Firma Analytical Instruments Specialities, USA.

Ultraschallbad, 80 kHz, Firma Diosi-Electronic, Wiesbaden.
Rotationsschüttel-Gerät, Firma Heidolph-Elektro KG.
Whirl-Mix, Firma Retsch.
Thermoblock 500/1000 W, Firma Liebisch, Brackwede.
UV-Lampe mit Stativ, Firma Desaga, Heidelberg.
Rotavapor mit Anschluß für Wasserstrahlpumpe.
Trockenschrank, Firma Heraeus, Osterode.
Desaga Simultan-Trennkammer, Firma Desaga, Heidelberg.
Schliffgläser Duranglas oder Quarz, 10/20 ml.
Pasteur-Pipetten 230 mm mit dazu passenden Saughütchen, Firma Brand.
DC-Platten Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator), Schichtdicke 0,2, Firma Merck, Darmstadt, No. 5553

3.3.2 Reagentien

Sephadex LH 20, Pharmacia, Schweden.
Iso-Octan z. Synth., Fa. Merck-Schuchardt 821627
Diisopropyläther z. Synth., Fa. Merck-Schuchardt 800866.
N_2-Flasche, Messer Griesheim GmbH, Frankfurt.
Cholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, San Diego, Cal./USA, Lot 210205
Lithocholsäure, a grade, Calbiochem, Lot 210014.
Hyodesoxycholsäure, Steraloids Inc., Pawling, N.Y./USA, Best.Nr. C 860.
Glyco-Hyodesoxycholsäure, Steraloids, Best.-Nr. C 890.
Tauro-Hyodesoxycholsäure, Steraloids, Best.-Nr. C 865.
Ursodesoxycholsäure, Steraloids, Best.-Nr. C 1020.
Chenodesoxycholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 210031.
Desoxycholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 210049.
Tauro-Cholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 310142.
Tauro-Lithocholsäure, Steraloids, Best.-Nr. C 1470.
Tauro-Desoxycholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 310105.
Tauro-Chenodesoxycholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 310013.

Gluco-Lithocholsäure, Steraloids, Best.-Nr. C 1435.
Glyco-Desoxycholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 410078.
Glyco-Chenodesoxycholsäure, Na-Salz, a grade, Calbiochem, Lot 210181.
Alle übrigen Chemikalien, die zur Grundausstattung des Labors gehörten, wurden in p.A.-Qualität eingesetzt.

3.4. Bestimmung des Musters der Gallensäurensulfate

3.4.1 Trennungsschritte

Nach Gewinnung der Duodenalsaftprobe wurden zunächst Innere Standardsdem Untersuchungsgut zugefügt, um dadurch die im Verlauf der verschiedenen Trennungsschritte erfolgenden Verluste quantifizieren zu können. Zur weiteren Aufarbeitung mußte die Gruppe der konjugierten Gallensäuren-Sulfate zunächst von den übrigen freien oder Taurin-bzw. Glycin-gekoppelten Gallensäuren getrennt werden. Diese Trennung wurde durch Säulen-Chromatographie nach der von Cronholm, Makino und Sjövall beschriebenen Methode durchgeführt (18). Bei Voruntersuchungen war festgestellt worden, daß bei der Elution nach der unten beschriebenen Methode die Gallensäurensulfate zusammen mit den Gallensäuren-Glucuroniden in der zweiten Phase erscheinen. Die Glucuronide störten bei der Untersuchung der Sulfate nicht, da sie stärker elektrisch geladen sind als freie und Taurin- oder Glycin-gekoppelte Gallensäuren. Bei der chromatographischen Trennung mit vornehmlich apolaren Lösungsmitteln bleiben sie am Auftragepunkt liegen.
Da sich weder die konjugierten Gallensäurensulfate, noch die gekoppelten Gallensäuren dünnschichtchromatographisch befriedigend trennen lassen, mußten die konjugierten Gallensäuren-Sulfate zunächst dünnschichtchromatographisch "trennbar" gemacht werden. Dazu dienten zwei Arbeitsgänge, nämlich die Abtrennung der Sulfat-Gruppen durch Solvolyse und die

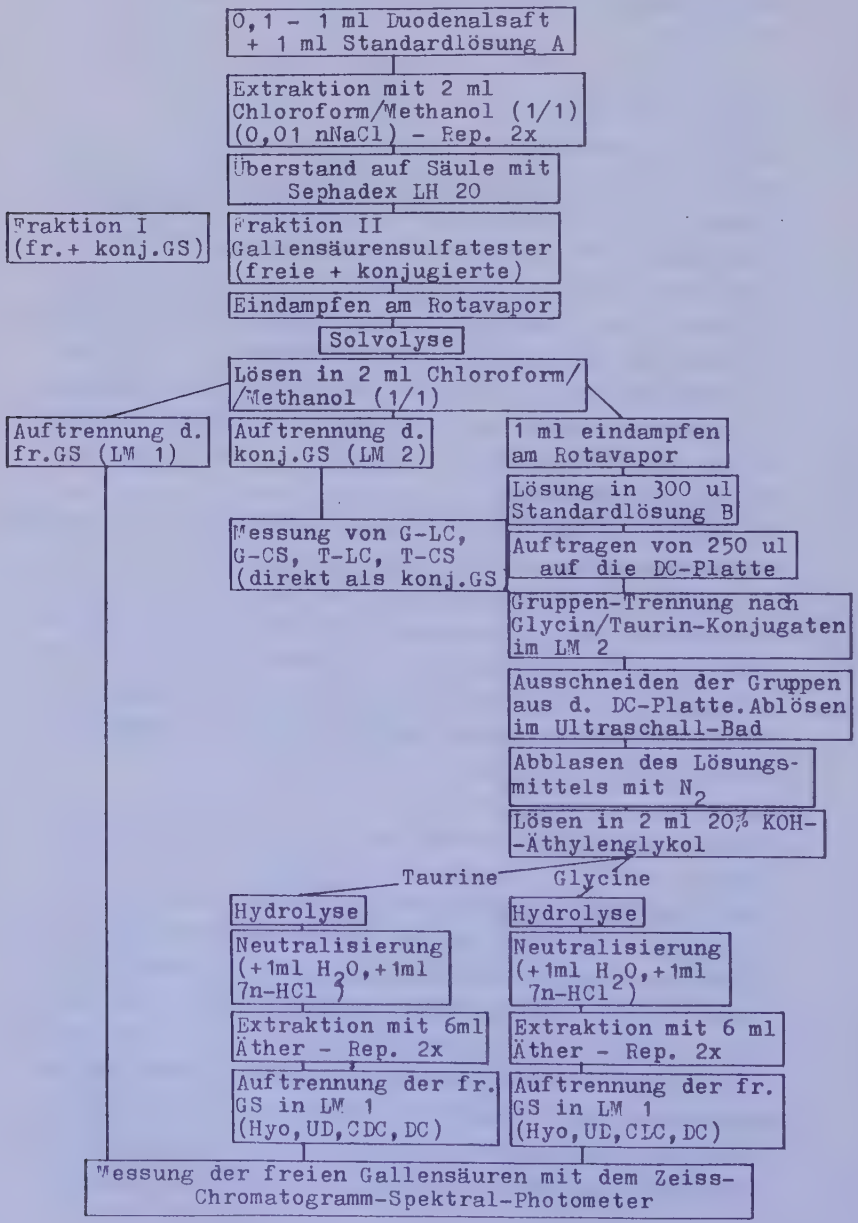
Abspaltung der Taurin- bzw. Glycin-Gruppe durch Hydrolyse

3.4.2 Innerer Standard

Um bei den geringen Mengen (100 µl) eingesetzten Duodenalsaftes die Gallensäurenkonzentration ermitteln zu können, war die Einführung von "Verlust-Indikatoren" unabdingbar. Nur mit Hilfe dieser sogenannten Inneren Standards ließen sich die Verluste bei der Säulentrennung, der Dünnschichtchromatographie, bei Extraktionen und chemischen Reaktionen abschätzen. Ein Innerer Standard muß jedoch folgende Voraussetzungen erfüllen:
a) Er muß sich bei den Trennungen und chemischen Aufbereitungen möglichst gleich wie die zu untersuchenden Substanzen verhalten.
b) Er darf nicht bereits in dem zu untersuchenden Material vorhanden sein.
Es lag deshalb nahe, als Standard eine beim Menschen nicht vorkommende Gallensäure zu verwenden. In dieser Arbeit wurden als Innere Standards die Hyodesoxycholsäure sowie deren Derivate benutzt, da sie bisher nur einmal bei Menschen mit angeborenem Stoffwechseldefekt nachgewiesen werden konnten (1, 2).

Beim Versuchsablauf wurden mehrere Innere Standards benötigt:
Der Darmsaft wurde einer chromatographischen Säulentrennung unterworfen; in der dabei erhaltenen Fraktion 2 wurden die freien und gekoppelten Gallensäuren-Sulfate eluiert. Dünnschichtchromatographisch nachweisbar waren jedoch nur die freien Gallensäuren, zu denen die Gallensäuren-Sulfate durch Solvolyse reduziert werden mußten. Verluste während dieser beiden Schritte konnten durch einen Inneren Standard, hier durch Hyodesoxycholsäuredisulfat (Standard 1) erfasst werden. Dieser Standard

Abb. 7 : Schematische Darstellung der Trennung der im Duodenalsaft enthaltenen Gallensäurensulfate.



wurde im Labor von Prof. Niessen in Anlehnung an die Methode von Palmer und Bolt synthetisiert (60, 66). Die konguierten Gallensäuren-Sulfate mußten jedoch auch einer hydrolytischen Spaltung unterworfen werden, da nur Taurin- bzw. Glycin-konjugierte Cholsäure, bzw. Lithocholsäure-Derivate direkt auf der Dünnschichtchromatographieplatte gemessen werden konnten. Alle anderen konjugierten Gallensäuren mußten hydrolysiert werden. Im Laufe dieses Trennungsvorgangs auftretende Verluste wurden durch weitere Innere Standards erfasst. Sowohl für die Taurinkonjugierten Gallensäuren als auch für die Glycin-konjugierten Gallensäuren mußten dabei eigene Innere Standards zugegeben werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die auf dem Marktbefindlichen Tauro-Hyodesoxycholsäure (Standard 2) und Glyco-Hyodesoxycholsäure (Standard 3) verwendet. Es wurden 2 Lösungen von Inneren Standards hergestellt. Die Standard-Lösung A enthielt, in Chloroform/Methanol (1:1) gelöst eine Mischung aus Standard 1 und Hyodesoxycholsäure (Standard 4). Die Hyodesoxycholsäure wurde zur Erfassung der Verluste der freien Gallensäuren, die bei der Säulentrennung in der Fraktion 1 eluiert wurden, eingeführt.

Standard-Lösung A

Hyodesoxycholsäure 0,05 µmol/ml (4)
Hyodesoxycholsäure-Disulfat 0,10 µmol/ml (1).

Standard 2 und 3 werden als weitere Standard-Lösung in Chloroform/Methanol (1:1) aufgelöst.

Standard-Lösung B

Tauro-Hyodesoxycholsäure 0,8 µmol/ml (2)
Glyco-Hyodesoxycholsäure 0,4 µmol/ml (3).

Beide Standard-Lösungen wurden bei -20° C gut verschlossen aufbewahrt.

3.4.3 Säulentrennung

Die Gallensäuren-Sulfatester wurden durch Säulenchromatographie von freien und gekoppelten Gallensäuren nach der Methode von Cronholm et al. getrennt (18).
Die Chromatographiesäulen wurden folgendermaßen zur Aufnahme des Duodenalsaftes vorbereitet:
a) Spülen der leeren Säule mit Methanol.
b) Füllung mit 5 g Sephadex LH-20, aufgeschwemmt in Methanol.
c) Langsames Ablaufen des Methanols.
d) Füllung des Reservoir-Gefäßes der Säule mit einer 1:1-Mischung aus Methanol/Chloroform, die 0,01 n-NaCl enthielt.
e) Ablassen des Lösungsmittels.
Danach wurden die Säulen verschlossen und einen Tag zum Quellen des Sephadex stehengelassen. Als Ansatz wurden 0,1 - 1 ml Duodenalsaft, 1 ml Standard-Lösung A (freie Gallensäuren und freie Sulfate) und 1 ml Chloroform/Methanol (1:1)-Mischung (0,01 n-NaCl) in einem verschließbaren konischen Zentrifugenglas mit einem Tropfen 1 nNaOH gemischt. Das verschlossene Gläschen wurde 3 Minuten in ein Ultraschall-Bad (80 kHz) gestellt, danach zentrifugiert und der klare Überstand mit Pasteur-Pipetten auf die unten geöffnete Sephadex-Säule aufgetragen.
Die Rückstände in den Zentrifugengläsern wurden noch 3 mal extrahiert und die Überstände auf die Säule überpipettiert. Nachdem das Lösungsmittel (8 ml) abgelaufen war, wurden 50 ml Chloroform/Methanol (1:1), 0,01 n-NaCl in das Reservoir-Gefäß der Säule gefüllt. Die Tropfgeschwindigkeit der Säule wurde auf 3 ml/ h eingestellt. Das Auffangglas mit der Faktion 1, die die freien und konjugierten Gallensäuren enthielt, konnte nach ungefähr 16 Stunden gegen ein zweites Glas ausgetauscht werden, das die zweite Fraktion mit den Gallensäuren-Sulfaten, den konjugierten Gallensäuren-Sulfaten und den Glucoroniden aufnahm. Zur Elution dieser zweiten Fraktion wurden 200 ml Methanol in die Reservoir-Gefäße gefüllt und die Tropfge-

schwindigkeit auf 12 ml/h einreguliert. Nach 17 Stunden war die Elution der Fraktion 2 beendet, die erhaltene Lösung wurde eingedampft und solvolysiert.

3.4.4 Solvolyse

Die Solvolyse wurde nach der Methode von Burstein und Liebermann in der Modifikation von Cronholm et al. durchgeführt (12, 18). Mit dieser Methode können Sulfatreste ohne Zerstörung des Gallensäure-Moleküls abgespalten werden. Die entstandenen freien Gallensäuren können dann direkt dünnschichtchromatographisch bestimmt werden, die Taurin- bzw. Glycin-gekoppelten Gallensäuren müssen noch einer hydrolytischen Spaltung unterzogen werden. Gallensäuren-Glucuronide, die ebenfalls in der Fraktion 2 eluiert wurden, werden bei der Solvolyse nicht gespalten (4). Da sie polarer als die freien und gekoppelten Gallensäuren sind, bleiben sie bei der dünnschichtchromatographischen Trennung im apolaren Lösungsmittel am Auftragepunkt liegen.

Die in 3.4.3 erhaltene Fraktion 2 wurde in 100 ml-Schliffkölbchen eingedampft und die trockenen Rückstände mit 3 ml Äthanol, 60 ml Aceton und 1 ml 1 n-HCl wieder gelöst. Die Kölbchen wurden fest verschlossen und für 48 Stunden in einem Wasserbad (37° C) inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 1 n-NaOH neutralisiert und am Rotavapor eingedampft. Mit 2 ml Chloroform/Methanol (1:1) wurde der Rückstand im Kolben im Ultraschallbad gelöst, in Schraubdeckelgläschen überpipettiert und zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

Durch die Solvolyse waren die ungekoppelten Gallensäuren-Sulfate, d.h. auch der zugefügte Innere Standard 1, zu direkt dünnschichtchromatographisch nachweisbaren freien Gallensäuren reduziert. Unter Berücksichtigung des Verlustfaktors war für sie bereits hier eine quantitative Bestimmung möglich.

Die gekoppelten Gallensäuren-Sulfate mußten jedoch nach der Solvolyse auch noch einer hydrolytischen Abspaltung ihres Taurin- bzw. Glycin-Restes unterzogen werden, bevor sie mit den verwendeten Methoden getrennt und quantitativ bestimmt werden konnten. Die bei der weiteren Aufarbeitung auftretenden Verluste, wie bei den gekoppelten Gallensäure-Sulfaten wurden mit Hilfe der hier neu eingeführten Inneren Standard-Lösung B (G-Hyo, T-Hyo) quantifizierbar.

3.4.5 Hydrolyse

Die Gallensäuren-Konjugate Glycin und Taurin wurden durch alkalische Hydrolye in Äthylenglykol mit 20% KOH abgetrennt (26, 69). Die Methode nach Feher, Papp und Kazig wurde so abgewandelt, daß die schlecht hydrolysierbaren Konjugate der Lithocholsäure direkt gemessen wurden (29).

Zur Hydrolyse wurde 1 ml der nach der Solvolyse erhaltenen Lösung bei 37° C mit Stickstoff abgeblasen und 300 µl Standard-Lösung B zugefügt. Die Rückstände wurden im Ultraschallbad gelöst und 250 µl mit dem Multi-spotter auf DC-Platten zur Gruppentrennung von Glycin und Taurin bei 60° C aufgetragen. Dieser Vorgang erfolgte möglichst langsam, um eine punktförmige Auftragung zu sichern. Auf die DC-Platten wurde - neben den zu untersuchenden Lösungen - gleichzeitig ein bekanntes Gallensäuren-Gemisch, bestehend aus verschiedenen Tauro- und Glyco-Gallensäuren, aufgebracht, das nach der Entwicklung als Leitchromatogramm zum Auffinden der Gruppen (siehe Abb. 11) verwendet wurde. Um einen möglichst gleichmäßigen Lauf des Leitchromatogramms und der aufgetragenen Proben zu erreichen, wurden 150 µl des bekannten Gallensäuren-Gemisches und 100 µl "Rest-Lösungen" der angesetzten Proben aufgetragen (Abb. 10). Die DC-Platten wurden am oberen Rand mit Alufolie verstärkt, um ein Durchhängen der Platten in der

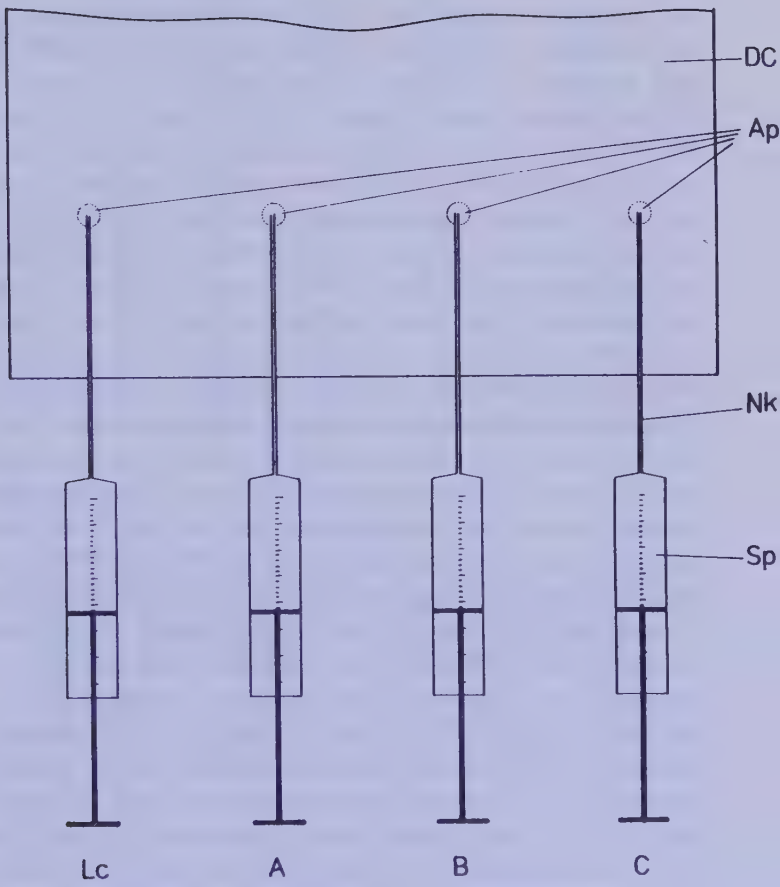


Abb. 8 : Auftragen der nach Solvolyse erhaltenen Proben, einer Mischung konjugierter Gallensäuren, und einer Leitchromatogramm-Lösung mit Hilfe des multi-spotter auf die DC-Platte zur Vorbereitung der Gruppen-Trennung.
Ap - Auftragepunkte der Proben, DC - Dünnschicht-Chromatographie-Platte, Nk - Nadelkapillare, Sp - Spritze mit µl-Kalibrierung.

Kammer zu verhindern und anschließend zur Trennung der Taurin- von den Glycin-konjugierten Gallensäuren in eine gesättigte Kammer mit dem Laufmittel 2 gestellt. Als Laufmittel 2 wurde Isoamylacetat/Propionsäure/n-Propanol/H_2O, 20/15/10/5 verwendet. Zur Gruppentrennung genügte ein Lauf, der ca. 3 1/2 Stunden dauerte. Die Platten wurden getrocknet und der Streifen mit dem Leitchromatogramm abgeschnitten, beschriftet und gefärbt. Dazu wurde er eine halbe Stunde bei 120° C in den Trockenschrank gelegt, dann 2 Minuten in ein Färbebad mit 5% H_2SO_4 Konz. in Methanol gestellt und danach 15 Minuten bei 100° C im Trockenschrank erhitzt. Die Gallensäurenpunkte wurden danach unter UV-Licht sichtbar und markiert. Der Leitchromatogramm-Streifen wurde an die zugehörige Platte geklebt und die Taurin- und Glycin-Bezirke der nicht gefärbten Anteile der Platten, gemäß Abb. 9 markiert, beschriftet und ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Plättchen wurden in beschriftete Schliff-Zentrifugengläser (Quarz- oder Duranglas) gegeben und bis zum Oberrand der Plättchen Wasser zugegossen. Die Kieselgelschicht löste sich nach ca. einer halben Minute im Ultraschallbad ab, die Alufolie wurde mit einer Pinzette herausgeholt, mit Methanol abgespült und dann weggeworfen. Die Schliffgläschen mit dem abgelösten Kieselgel wurden mit einer Klammer verschlossen, zunächst für 3 Minuten ins Ultraschallbad (50° C warmes Wasser) gestellt, für 30 Sekunden mit dem Whirl-Mix nochmals ordentlich durchmischt und dann für 30 Minuten bei 80° C in einem Thermoblock erhitzt. Darin wurden anschließend auch die Lösungsmittel H_2O und CH_3OH bei 80° C mit N_2 abgeblasen. Anschließend wurden zur alkalischen Hydrolyse 2 ml 20%ige KOH-Äthylenglykollösung (6 g KOH-Plätzchen in 30 ml Äthylenglykol) den Rückständen in den Zentrifugengläschen zugegeben. Die verschlossenen Röhrchen wurden für 15 Minuten in ein Wasserbad (50° C) gestellt, danach mit dem Whirl-Mix gemischt, 30 Sekunden in das Ultraschallbad gestellt, erneut mit

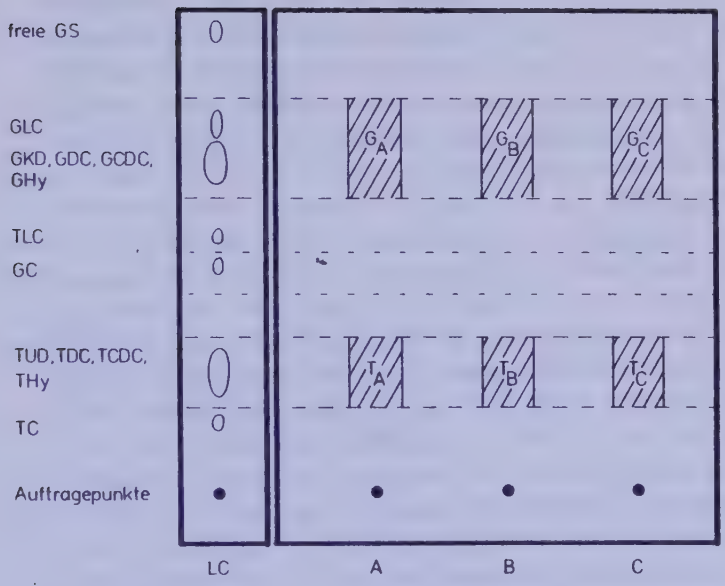


Abb. 9 : Chromatogramm-Platte nach Trennungsläufen einer Mischung konjugierter GS (in Laufmittel 2) und Entwicklung des - abgeschnittenen - Leitchromatogramms. Markierung der auszuschneidenden, bestimmte konjugierte GS-Gruppen enthaltenden Areale.
A,B,C - zu untersuchende Proben konj.GS, der Pat.A...,
G_A - schraffiertes Feld enthält die Glycin-konj. GS der Probe A, LC - Leitchromatogramm,
T_A - Feld enthält Taurin-konj.GS der Probe A.

dem Whirl-Mix durchmischt, nochmals 5 Minuten ins Wasserbad gestellt und schließlich für 15 Minuten gut verschlossen auf den Drehschüttler gespannt. Anschließend wurden die unverschlossenen Gläschen zur Hydrolyse für 20 Minuten bei 210° C in einen Thermoblock gestellt. Nach dem Abkühlen wurden die - nunmehr freien - Gallensäuren extrahiert, indem 1 ml H_2O, 1 ml 7 n-HCl und 6 ml Äther zugefügt wurden. Danach wurden die mit Klammer fest verschlossenen Schliffgläschen nacheinander mit dem Whirl-Mix gemischt, für 5 Minuten ins Ultraschallbad gestellt, 5 Minuten im Drehschüttler geschüttelt und schließlich 5 Minuten bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit bezeichneten Pasteur-Pipetten abpipettiert und am Rotavapor eingedampft. Dieser Extraktionsvorgang wurde zweimal mit Zugabe von 5 ml Äther wiederholt. Den Überstand der dritten Extraktion im "Rotavapor-Röhrchen" wurden 1 ml H_2O und 0,5 ml 7 n-HCl zugefügt, geschüttelt, die Mischung in ein frisches Zentrifugengläschen geschüttet und zentrifugiert. Der Überstand wurde in das "Rotavapor-Röhrchen" zurückpipettiert und eingedampft. Diese Extraktion wurde zwei mal mit je 6 ml Äther wiederholt. Nach der letzten Extraktion wurde das Lösungsmittel auf ca. 2 ml abgedampft, mit den Pipetten in Schraubdeckelgläschen überpipettiert und vollständig eingedampft (mit N_2 bei 40-50° C).

1 ml Chloroform/Methanol (1:1) wurde zu dem trockenen Rückstand in den Schraubdeckelröhrchen pipettiert und mit Hilfe von Ultraschall (5 Min.) und Drehschütteln (5 Min.) eine Lösung hergestellt, die anschließend 15 Minuten zentrifugiert wurde. Von dem Überstand wurden 20 µl abpipettiert und mit Hilfe des Multi-spotter auf die DC-Alufolien-Kieselgel-Platten aufgetragen. Zum Vergleich der Laufstrecken und der Indentifizierung der Gallensäuren wurde ein Leitchromatogramm mit einer Mischung aus bekannten freien Gallensäuren (15 µl Vergleichslösung und

5 µl Hydrolysat) auf jeder Platte aufgetragen. Zur Erfassung der unterschiedlichen Entwicklung der Platten - und somit der unterschiedlichen Fluoreszenzstärke - wurde ein Plattenstandard auf jeder DC-Platte aufgetragen, der aus Lithocholsäure (0,1 mol, 20 µl) in Chloroform/Methanol (1:1) bestand. Jede Probe wurde auf 2 DC-Platten aufgetragen und bestimmt.

3.4.6 Trennung der gekoppelten und freien Gallensäuren auf Dünnschichtchromatographie-Platten

Bei Voruntersuchungen hatten sich zwei Laufmittel herausgestellt, die den Trennungsanforderungen am ehesten entsprachen und die teilweise von Hofmann angegeben sind (38, 45, 60):

a) Für die gekoppelten Gallensäuren wurde das Laufmittel 2 (Isoamylacetat/Propionsäure/n-Propanol/H_2O, 20/15/10/5) verwendet, in dem die freien Gallensäuren, die die wenigsten polaren Gruppen und somit die geringste Wasserlöslichkeit haben, am weitesten wandern, die polaren Glycin- bzw. Taurin-Konjugate sich jedoch schlechter von der stationären Phase trennen, d.h. einen niedrigeren Rf-Wert haben (Abb. 11). Dieses Laufmittel wurde, außer zur Trennung der Taurin- und Glycin-Gruppen (vergl. 3.4.5), auch zur direkten Bestimmung der Taurin- und Glycin-Derivate der Chol- und Lithocholsäure verwendet. Zu der direkten Bestimmung mußten die Platten allerdings 2 x 3 1/2 Stunden in gleicher Richtung laufen.

b) Im Laufmittel 2 fanden sich die polaren freien Gallensäuren bei Auswertung fast an der Lösungsmittelfront. Um diese Gruppen weniger weit wandern zu lassen und möglichst zu spreizen, mußte ein Lösungsmittelgemisch verwendet werden, das weniger polare Gruppen enthielt. Hier eignete sich ein "Rezept", das Hofmann angegeben hatte und das zur optimalen Trennung von Niessen noch leicht ab-

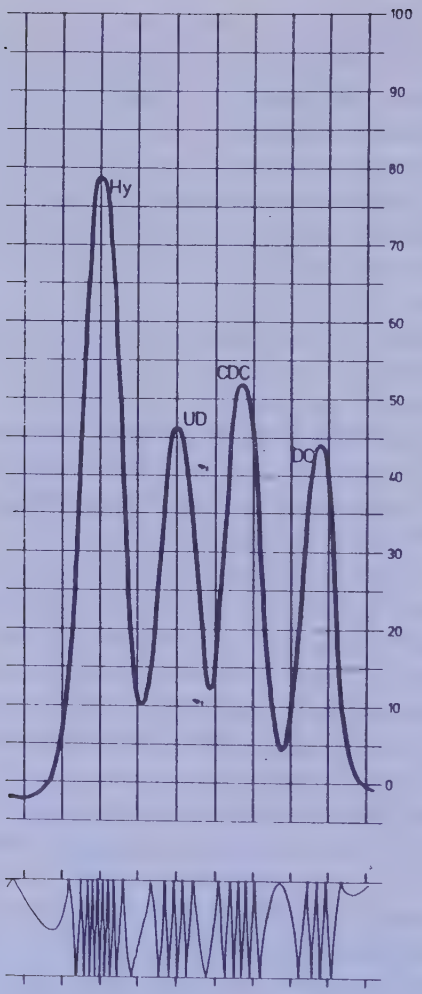


Abb.10: Fluoreszenz-Kurve einer Mischung von freien Gallensäuren mit unten dargestellten Integralen über der Null-Linie.
Hy - Hyodesoxycholsäure, UD - Ursodesoxycholsäure, CDC - Chenodesoxycholsäure, DC - Desoxycholsäure.

geändert wurde (38, 60). Mit dem Gemisch Isooctan/Diisopropyläther/Eisessig im Verhältnis 8/5/5 (Laufmittel 1) konnten die freien Gallensäuren aufgetrennt werden, ohne daß Störungen durch Glucuronide, Sulfate oder Konjugate auftraten. Zur sauberen Trennung waren zwei Läufe in gleicher Richtung auf DC-Alufolie-Kieselgel-Platten nötig, die in einer mit Filterpapier ausgeschlagenen, gesättigten Kammer bei 21° C stattfanden (Laufzeit: 2 x 75 Min.).

3.4.7 Auswertung der Chromatogramme

Van den Ende wie auch Brühl und Schmidt wiesen auf die Möglichkeit hin, die Fluoreszenz der Gallensäuren direkt auf der DC-Platte zur quantitativen Bestimmung auszunützen (10, 75). Damit wurden die Nachweisgrenzen um eine Zehnerpotenz nach unten verschoben (vergl. 2.2.). Bei unseren Untersuchungen verwandten wir einen Zeiss-Chromatogramm-Spektral-Photometer KM 3 der monochromatisches Licht der Wellenlänge 405 nm mit einer Quecksilberlampe erzeugte. Die auf diese Weise angeregten Gallensäuren-Punkte emittierten UV-Strahlung, die nach Passage eines Sperrfilters von 440 nm (die reflektierte Anregungsstrahlung wurde auf diese Weise "herausgesiebt") von einem Fotomultiplier im Meßkopf verstärkt und an den Schreiber weitergegeben wurde (Abb. 6, 7). Alle Laufbahnen der Gallensäuren wurden mit einer spaltförmigen Blende und dem Meßtischvorschub von 50 mm/min abgefahren. Je 20 µl der aufgearbeiteten Proben wurden mit einem Multi-spotter 2-fach auf DC-Alufolie-Kieselgel-Platten aufgetragen. Auf jeder DC-Platte lief außerdem ein Gemisch bekannter freier Gallensäuren als Leitchromatogramm und 20 µl 0,1 mol Lithocholsäure in Chloroform/Methanol (1:1) als "Plattenstandard" mit, der zur Bestimmung der Plattenanregung und somit zur Quantifizierung unterschiedlicher Plattenaktivität bzw. Gallensäuren-Fluoreszenz diente (43). Nach der Auftrennung der gekoppelten bzw. freien Gallensäuren in den DC-Kammern (Laufmittel 2 bzw. 1) wurden die Platten getrocknet,

dann 30 Minuten im Trockenschrank bei 120° C zum Entfernen von Lösungsmittelresten erhitzt. Die erkalteten Platten wurden danach 2 Minuten lang in ein H_2SO_4-Bad (5% H_2SO_4-Konz. in Methanol) zur Entwicklung der Fluoreszenz gestellt und danach nochmals 15 Minuten bei 100° C in den Trockenschrank gelegt. Die Gallensäuren waren damit angeregt und fluoreszierten bei Bestrahlung mit UV-Licht (proportional zu ihrer Konzentration). Die Platten mußten zunächst 20 Minuten abkühlen, bevor die Bahnen markiert wurden. Danach wurden sie auf den Meßtisch des Zeiss KM 3 gelegt, mit einer 2 mm starken Glasplatte bedeckt und der Platten-Nullpunkt an einer Gallensäuren-freien Stelle eingestellt. Danach wurde der Meßtisch so eingestellt, daß der emittierte UV-Strahl (Abb. 6) die Laufbahn der Lithocholsäure, d.h. des Plattenstandards nach Anschalten des automatischen Meßtisch-Vortriebes abfuhr. Der Plattenstandard wurde am Integrator des Schreibers auf 10.000 Integral-Einheiten geeicht. In der Folge wurden die einzelnen Bahnen der aufgetragenen Proben und des Leitchromatogramms nacheinander auf die oben beschriebene Weise abgefahren und vom UV-Strahl nach Gallensäuren "abgetastet". Nach Bestimmung der Integrale je Gallensäure-Peak konnte mit Hilfe von Eichkurven bzw. der gewonnenen Formeln die Konzentration der Gallensäuren in diesem Peak und somit die Konzentration der Gallensäuren in der aufgetragenen Probenlösung bestimmt werden.

3.4.8 Eichkurven

Bei standardisierten Versuchsbedingungen, d.h. gleichbleibender Entwicklung der Dünnschichtchromatographie-Platten (Anregungsmethode), lassen sich nach der oben beschriebenen Methode Eichkurven herstellen, durch die die feste Beziehung zwischen der Intensität der Emissionsstrahlung und der Konzentration des Gallensäurenfleckes auf der Dünnschicht-

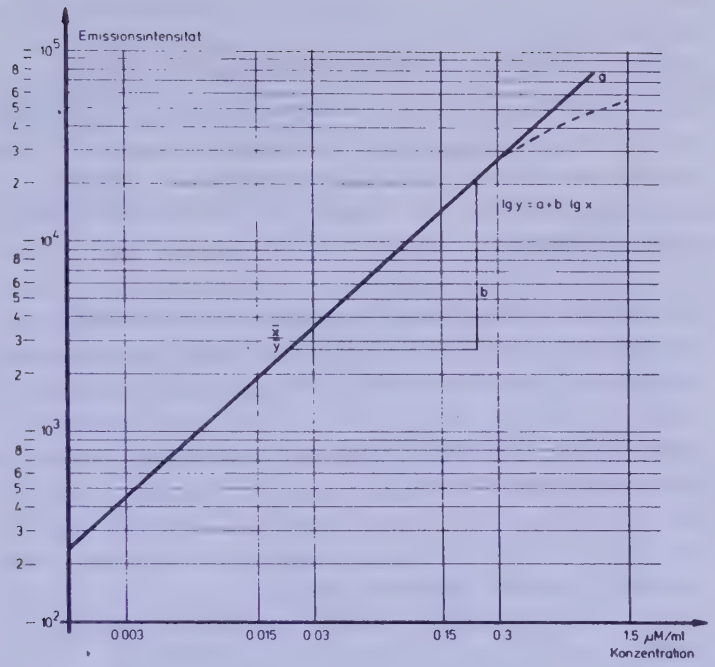


Abb. 11 : Beispiel der Eichkurve einer Gallensäure. Darstellung doppellogarithmisch, da sich ein linearer Zusammenhang über 2-3 Zehnerpotenzen ergab. Abszisse: Konzentration der GS-Lösung, Ordinate: Emissionsintensität in Integral-Einheiten. a = lg y für Konz.x = 1, b = Steigung der Eichkurve, $\bar{x}/\bar{y}$ = Serienmittelwert.

chromatographie-Platte graphisch und formelmäßig festgehalten wird (74). Wie zu erwarten war, stellte sich bei Voruntersuchungen heraus, daß Punkte verschiedener Gallensäuren mit gleicher Konzentration unterschiedliche Intensitäten der Emissionsstrahlung aufweisen (45, 60).
Für alle untersuchten Gallensäuren mußten deshalb vor Beginn der Darmsaftuntersuchungen Eichkurven hergestellt werden. Dabei wurden Gallensäurengemische bekannter Konzentrationen dünnschichtchromatographisch getrennt und mehrfach gemessen, das Ergebnis der Messungwurde über einen Potentiometerschreiber ausgedruckt (Abb. 8).

Aufgrund der erhaltenen Meßwerte wurden Eichkurven erstellt, die einen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und emittierterFluoreszenzstrahlung über 2-3 Zehnerpotenzen ergaben. Abb.11 zeigt eine solche Eichkurve, die wegen des großen Meßbereichs auf doppellogarithmischem Papier dargestellt ist.

Der Verlauf der Eichkurve konnte mit Hilfe eines Computers (Hewlett-Packard) nach der Formel

$$\lg y = a + b \cdot \lg x$$ errechnet werden.

x = gemessene Konzentrationen der GS
y = Integraleinheiten des Integrators
a = rückgerechnete Zahl der Integraleinheiten einer GS-Konz. von 1 µmol/ml
b = Steigung der Eichkurve im linearen Bereich (Punkt $\bar{y}/\bar{x}$)

Dazu wurden die Probenanzahl, die verwendeten Konzentrationen, die Mittelwerte einer Serie sowie die Standardabweichung der Integraleinheiten in den Computer eingegeben.

Zur Feststellung der unteren Nachweisgrenze von konjugierten Gallensäuren-Sulfaten wurden Voruntersuchungen durchgeführt, bei denen sich herausstellte, daß nach der oben beschrie-

benen Methode konjugierte Sulfate der Ursodesoxycholsäure und der Desoxycholsäure bis zu einer Konzentration von 2 nmol/ml im eingesetzten Darmsaft, konjugierte Sulfate der Chenodesoxycholsäure bis 6 nmol/ml Darmsaft nachgewiesen werden können (60).

3.4.9 Auswertung und Statistik

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob signifikante Unterschiede im Gallensäurenmuster der freien und gekoppelten Gallensäuren-Sulfate bei gesunden Kindern verschiedener Altersgruppen und bei Kindern mit verschiedenen gastrointestinalen Krankheiten bestehen.

Unter Einbeziehung der Ausbeuten und der Verdünnungen wurden zunächst die Konzentrationen der Gallensäuren in den Duodenalsaftproben nach folgender Formel rückgerechnet:

$$C_x = C_p K_v \frac{1}{A_{HS}} \frac{1}{A_{HH}} \frac{200}{y}$$

C_p = Konzentration der GS auf der DC-Platte in µmol/ml (gemessene Fluoreszenz-Intensität, nach den Eichkurven bzw. -Formeln rückgerechnet in µmol/ml).

K_v = Verdünnungskonstante, die sich aus den mehrfachen Verdünnungs- bzw. Konzentrierungsschritten ergibt.

C_x = Konzentration der Gallensäure im Duodenalsaft in µmol/ml.

A_{HS} = Ausbeute an Innerem Standard Hyo-S nach Solvolyse in Prozent

A_{HH} = Ausbeute an Innerem Standard G/T-Hyo nach Hydrolyse in Prozent.

y = Menge des eingesetzten Darmsaftes in µl (in der Regel 200 µl).

In Voruntersuchungen wurde festgestellt, daß die Gallensäuren logarithmisch normal verteilt waren. Nach logarithmi-

mischer Transformation der Meßergebnisse konnten die erhaltenen Konzentrationen der einzelnen Gallensäuren-Sulfatester addiert werden. Danach wurde der Anteil eines Gallensäure -Sulfatesters an der Summe der Taurin- bzw. Glycinkonjugierten Gallensäuren-Sulfatester eines Individuums in Relativ-Prozent angegeben. Das Rechnen mit Numeri trug zur Vereinfachung des Rechenvorgangs bei, die statistische Untersuchung wurde deshalb mit diesen Prozentangaben durchgeführt.

Folgende Gallensäuren wurden jeweils auf ihre relative Häufigkeit im Untersuchungsgut geprüft:

a) Anteile der einzelnen Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfate (TCS-S/TUD-S/TCDC-S/T-DC-S/T-LC-S) in Relativ-Prozent der Gesamt-T-GS-S.
b) Anteile der Summe der T-GS-S in Relativ-Prozent der Gesamt-Taurin-gekoppelten Gallensäuren.
c) Anteile der Summe der T-GS-S in Relativ-Prozent der Gesamt-Gallensäuren-Sulfate.

Die gleichen Untersuchungen wurden für die mit Glycin gekoppelten Gallensäuren-Sulfate durchgeführt. Weiterhin wurde der Anteil der Gesamt-Sulfate an der Menge der Gesamt-Gallensäuren im untersuchten Darmsaft bestimmt. Schließlich wurde noch ein Quotient aus der Summe aller Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfate zu der Summe aller Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfate gebildet.

Für jede konjugierte Gallensäure (z. B. T-CDC-S) einer Gruppe von n Patienten (z. B. Säuglinge) wurde der Mittelwert $\bar{x}$ der relativen Häufigkeit dieses konjugierten Gallensäure-Sulfatesters an der Gesamtheit der z. B. Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatester errechnet. Als weitere statistische Parameter wurden die Standard-Abweichung s, der Standard-Fehler $\bar{s} = \frac{s}{\sqrt{n}}$ und die Varianz s^2 der

jeweiligen Gruppe errechnet. Diese Rechnung wurde für alle oben beschriebenen Gruppen durchgeführt. Unterschieden sich die Altersgruppen der gesunden Kinder nicht signifikant in ihren Konzentrationswerten, wurden sie zu einer gemeinsamen Kontrollgruppe zusammengefasst. Danach wurde ein Gruppenvergleich der Mittelwerte $\bar{x}$ jeder Gallensäure zusammen mit den Streubereichen des Standard-Fehlers $\bar{x} \pm \bar{s}$ auf ein Diagramm aufgetragen, um auf diese Weise Gruppen zu unterscheiden. Bei Gruppen, bei denen ein signifikanter Unterschied möglich oder wahrscheinlich erschien, wurde ein F-Test zur Feststellung homogener bzw. inhomogener Varianzen durchgeführt. Hatten 2 miteinander verglichene Gruppen eine homogene Varianz, wurde als Signifikanztest ein Student-t-Test angewendet. Bei inhomogener Varianz wurde ein Approximationstest benutzt (34, Geigy Tabellen, S. 209 f, Formel 599 bzw. 614-617).

4. Ergebnisse

4.1. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe wurde aus 38 gesunden Kindern gebildet, bei denen im Laufe einer gründlichen Untersuchung kein Hinweis auf das Vorliegen einer gastrointestinalen Erkrankung gefunden wurde. Die Kinder kamen zum Beispiel wegen rezidivierender Durchfälle (22 Kinder) im krankheitsfreien Intervall oder wegen Gedeihstörungen zur Untersuchung. Insbesondere wurden Erkrankungen von Pankreas, Leber und Dünndarm ausgeschlossen. Symptomfreie, gesunde Kinder wurden wegen der recht eingreifenden Untersuchungen nicht als Kontrollpersonen ausgewählt.

Die Kontrollgruppen wurden nach Alterskriterien in 4 unterschiedlich große Untergruppen aufgeteilt:
9 Säuglinge (in den Tabellen mit A gekennzeichnet) im Alter zwischen 3 und 12 Monaten.
14 Patienten bildeten die Kleinkind-Gruppe (13 bis 36 Monate, B).
9 Patienten wurden in der Vorschul-Gruppe (3 bis 6 Jahre, C) zusammengefasst und
8 Patienten gingen bereits zur Schule (älter als 6 Jahre, D).

Zunächst wurden nach der oben (Kapitel 3.4.9) beschriebenen Vorgehensweise die Gruppen der gesunden Kinder miteinander verglichen. Besonderes Augenmerk gelegt wurde dabei auf das Muster der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester bei Säuglingen (A), im Vergleich zu den Gruppen der älteren Kinder (älter als 1 Jahr, B bis D). Dabei zeigte sich, daß die Unterschiede in der relativen Häufigkeit der einzelnen Gallensäuren im Gruppenvergleich das Signifikanzniveau ($p < 0{,}05$) im allgemeinen nicht erreichten. Von dieser Regel gab es 2 Ausnahmen: Die Glyco-Ursodesoxycholsäure-Sulfatester (G-UD-S) und die Tauro-Desoxycholsäure-Sulfatester (T-DC-S). Beim Vergleich der Säuglingsgruppe mit

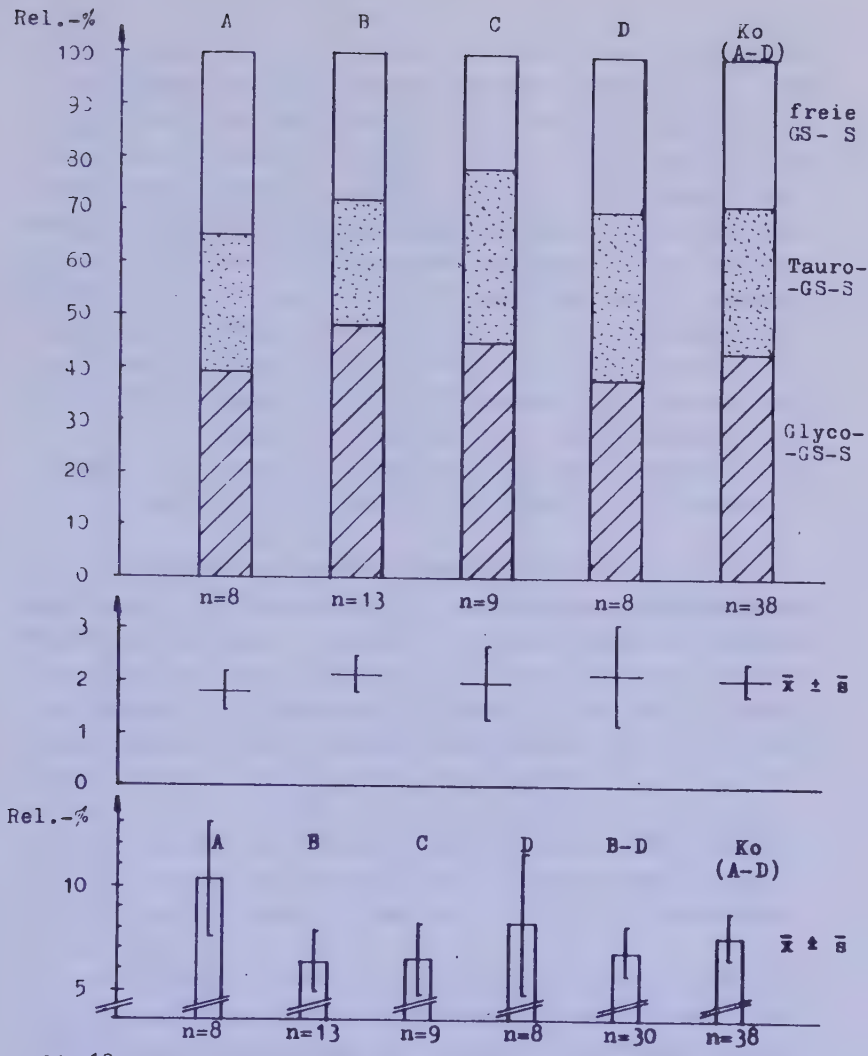


Abb. 12

oben — Prozentuale Verteilung der GS-S bei gesunden Kindern, untergliedert nach Taurin- u.Glycin-Konjugaten und freien GS-S. Säulen-Unterteilung nach Altersgruppen : Säuglinge - A, Kleinkinder - B, Vorschulkinder - C, Schulkinder - D. Ko - Kontrollgruppe, gebildet aus den 4 Gruppen A - D.

Mitte — Quotient aus der Summe aller Glycin-konj.GS-S zur Summe aller Taurin-konj. GS-S. Angabe mit Standardfehlerbreite ±s̄ (vgl. Kap.3.4.9.).

unten — Relative Häufigkeit aller Sulfate an den Gesamt-GS.

der Gruppe der älteren Kinder (> 1 Jahr) bei G-UD-S lag bei den Säuglingen der prozentuale Anteil der G-UD-S mit $\bar{x}$ = 1,5% um durchschnittlich 6,9% niedriger als bei der Vergleichsgruppe (B bis D). Diese Verminderung ist hochsignifikant ($p < 0,01$). Auch bei der Häufigkeitsverteilung der T-DC-S war der Unterschied zwischen der Säuglingsgruppe (A) und den 3 zusammengefassten Gruppen der älteren Kinder (B bis D) hochsignifikant ($p < 0,01$). Lag bei den Säuglingen das Mittel bei ca. 6,2% war bei der Vergleichsgruppe (B bis D) die T-DC zu durchschnittlich 13,5% am Muster der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester vertreten. Bei den Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern lag die Desoxycholsäure bei den Säuglingen dagegen nur im unteren Normbereich der Gruppen der älteren Kinder (B bis D).

Da bei der Verteilung des Gallensäuren-Sulfatmusters mit den genannten Ausnahmen keine altersabhängigen Unterschiede festgestellt werden konnten, wurden bei den übrigen untersuchten Fragestellungen die 4 Altersgruppen der untersuchten Kinder (A bis D) zu einer Kontrollgruppe (Ko) zusammengefasst, mit der im Folgenden das Muster der Gallensäuren-Sulfatester der Gruppen der kranken Kinder verglichen wurde.

Bei den G-UD-S wurden, ebenso wie bei den T-DC-S, die 3 Gruppen der älteren Kinder (B bis D) als Kontrollgruppe zusammengefasst und die Säuglinge getrennt betrachtet.

Die Summe der konjugierten und freien Gallensäuren-Sulfatester bildete mit durchschnittlich 7,7% nur eine relativ kleine Untergruppe im Muster der gesamten Gallensäuren im Darmsaft der untersuchten Kinder. Beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen gesunder Kinder wurde kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) festgestellt.

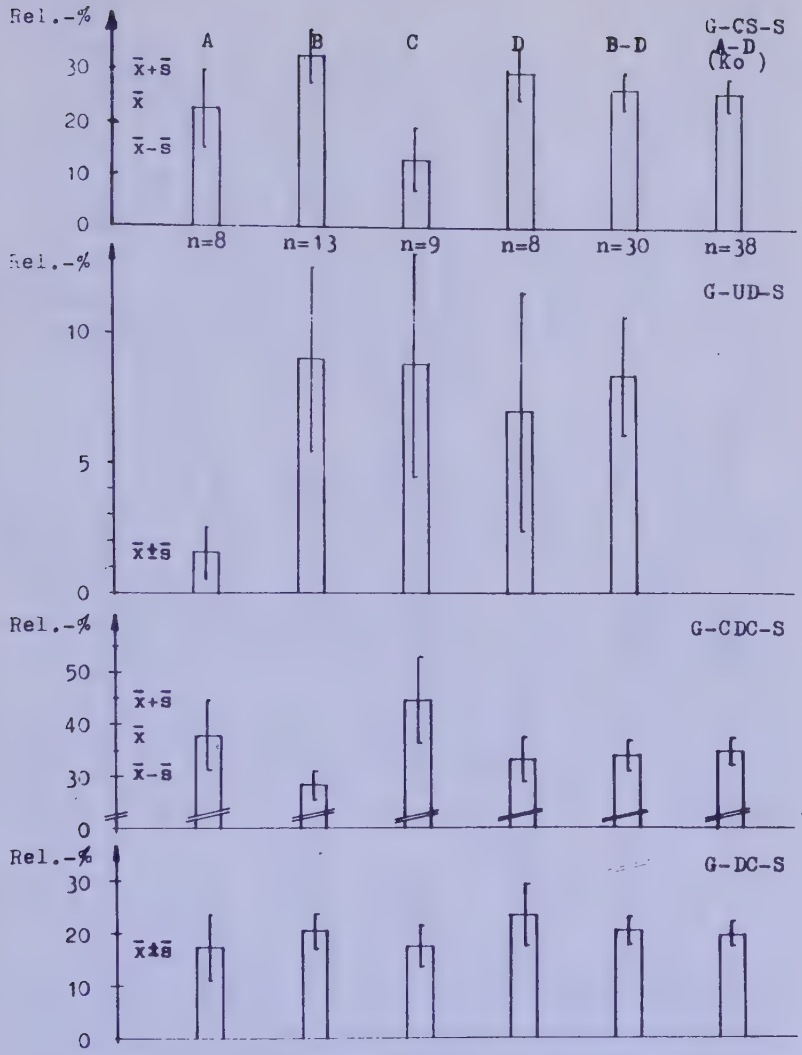


Abb.13: Mittlere rel.Häufigkeit $\bar{x}$ mit Standardfehlerbreite$\pm\bar{s}$ der
oben Glycocholsäure-Sulfatester
2.v.o. Glycoursodesoxycholsäure-Sulfatester
3.v.o. Glycochenodesoxycholsäure-Sulfatester
unten Glycodesoxycholsäure-Sulfatester
an der Summe der Glycin-konj.GS-Sulfatester.
Bei G-UD-S fehlt die Kontrollgruppe (Ko = A-D), da A signifikant gegen B-D ist ($p<0,01$).
A-Säuglinge, B-Klein-, C-Vorschul-, D-Schulkinder,
A-D=Ko - Kontrollgruppe, B-D - Ko ohne Säuglinge.

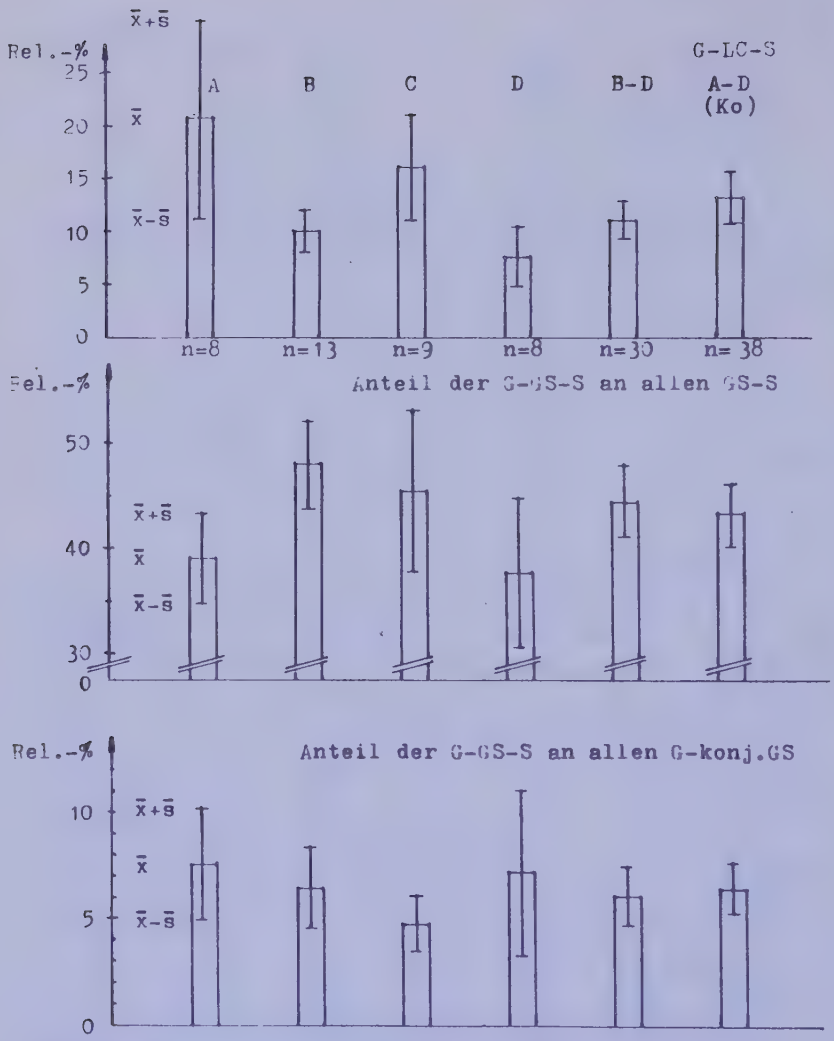


Abb. 14: Mittlere relative Häufigkeit $\bar{x}$ mit Standardfehlerbreite $\pm\bar{s}$

oben des Glycolithocholsäure-Sulfatesters an der Gesamtheit der Glycin-konj.Gallensäurensulfatester.

Mitte der Glycin-konj.GS-Sulfatester an allen Gallensäurensulfatestern.

unten der Glycin-konj.GS-Sulfatester an allen Glycin-Konjugaten (G-GS).

(A - Säuglinge, B - Klein-, C - Vorschul-, D - Schulkinder; Kontrollgruppe (A-D) -alle 4 gen.Gruppen gesunder Kinder zusammengefaßt, B-D = Ko ohne Säuglinge.

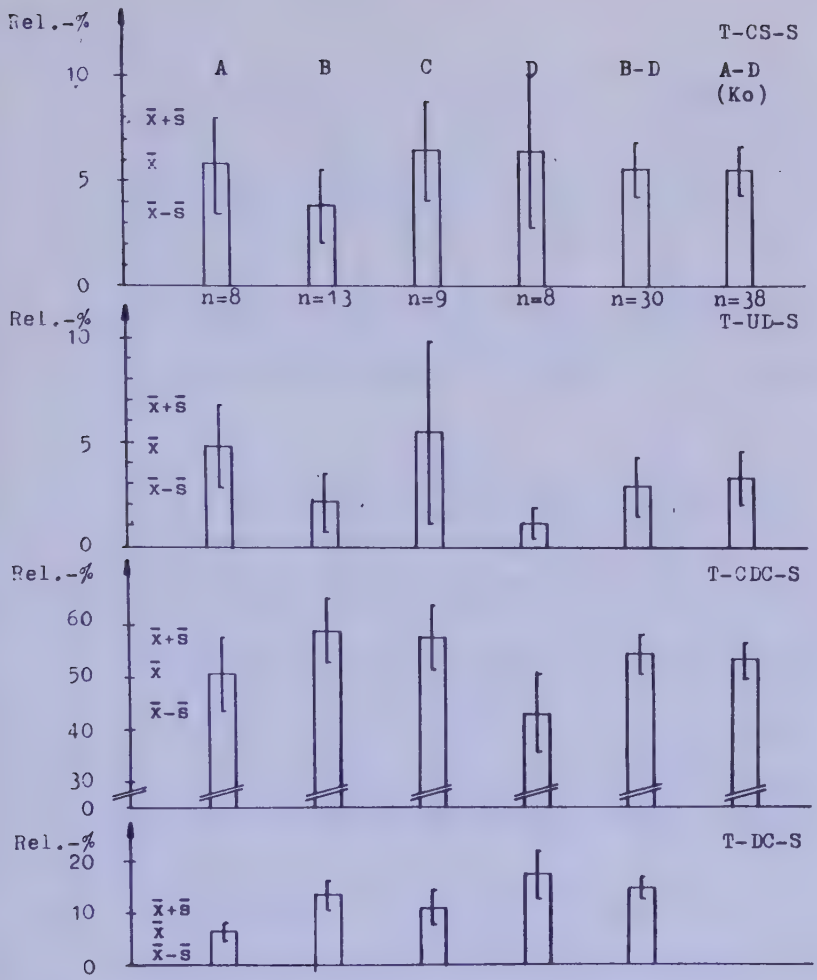


Abb. 15: Darstellung der relativen Häufigkeit einzelner Taurin-konj. GS-S an der Summe aller T-GS-S. Angabe der Gruppenmittelwerte mit Standardfehlerbreite ($\bar{x} \pm \bar{s}$). In Säulenform dargestellt sind 4 Altersgruppen gesunder Kinder : A - Säuglinge, B - Kleinkinder, C - Vorschulkinder, D - Schulkinder. B-D = zusammengefasste Gruppe der älteren Kinder (>1 Jahr). A-D = Kontrollgruppe aus allen gesunden Kindern.

oben Taurocholsäuresulfatester
2.v.o. Tauroursodesoxycholsäuresulfatester
3.v.o. Taurochenodesoxycholsäuresulfatester,
unten Taurodesoxycholsäuresulfatester; hier fehlt die übliche Kontrollgruppe (Ko = A-D), da A signifikant gegen B-D ($p<0,01$).

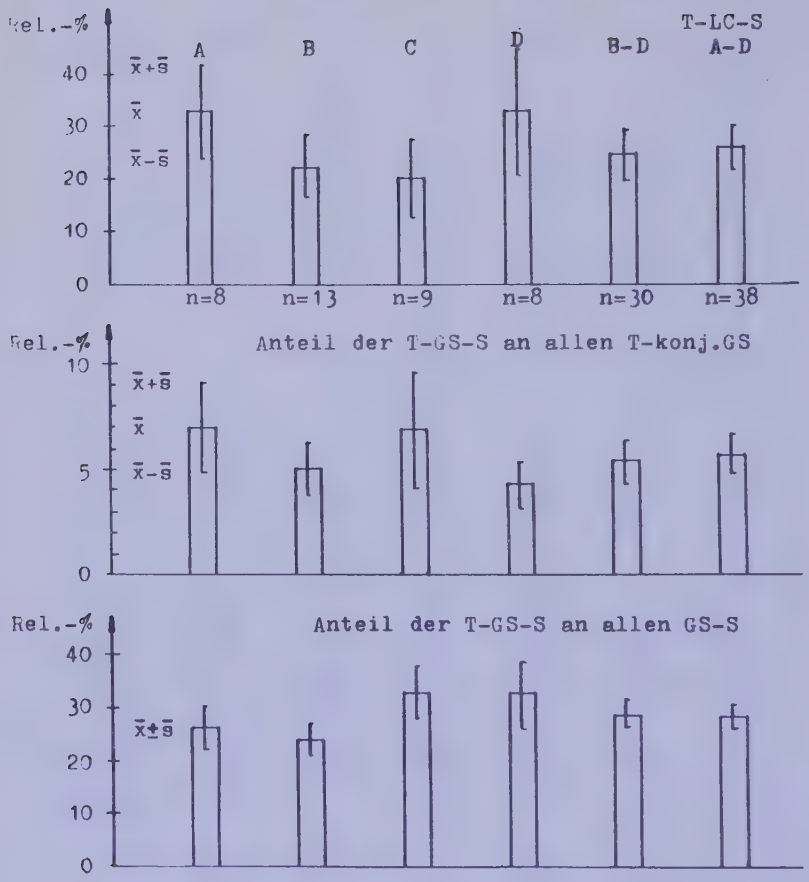


Abb. 16: Verteilung der mittleren relativen Häufigkeit $\bar{x}$ mit Standardfehlerbreite $\pm \bar{s}$ bei den verschiedenen Altersgruppen der gesunden Kinder: A - Säuglinge, B - Kleinkinder, C - Vorschulkinder, D - Schulkinder. Kontrollgruppe (A-D) aus Kindern aller 4 Altersstufen, Gruppe B-D zum speziellen Vergleich Säuglinge - ältere Kinder.

oben Taurolithocholsäuresulfat (-ester),

Mitte Anteil der gesamten Taurin-konj. Gallensäurensulfate an der Gesamtheit der Taurin-konj. Gallensäuren.

unten Relative Häufigkeit der Taurin-konj.Gallensäurensulfate an der Summe der GS-Sulfate.

Glycin-konjugierte Gallensäuren-Sulfatester bildeten mit durchschnittlich 43% an der Menge der gesamten Sulfatester die größte Gruppe, gefolgt von den Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern und den freien Gallensäuren-Sulfatestern, die jeweils im Mittel zu 28% vorkamen.

Der Quotient aus Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfaten zu Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfaten war ebenfalls altersunabhängig ($p > 0,05$) und belief sich im Mittel auf 2,04/1.

Der Anteil der Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfate an den gesamten Glycin-konjugierten Gallensäuren war mit durchschnittlich 6,5% gering, ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Altersgruppen gesunder Kinder wurde nicht gefunden. Der Prozentsatz der Taurin-gekoppelten Gallensäuren-Sulfate an den gesamten Taurin-gekoppelten Gallensäuren-Sulfaten lag mit durchschnittlich 5,7% in der gleichen Größenordnung, auch hier konnte keine Altersabhängigkeit festgestellt werden.

4.2. Vergleich der Gruppen der kranken Kinder mit den Kontrollgruppen

4.2.1 Vorgehensweise

Die Muster der Gallensäuren-Sulfate einer Kontrollgruppe gesunder Kinder wurden mit dem Muster der Gruppen der kranken Kinder verglichen. Da nur bei G-UD-S und T-DC-S eine altersabhängige Verteilung der Gallensäuren bei den Säuglingen (A) gefunden worden war, konnte bei allen übrigen Gallensäuren eine Kontrollgruppe aus (Ko) aus den 4 Gruppen (A bis D) der gesunden Kinder gebildet werden. Bei G-UD-S und T-DC-S wurde diese Gruppe unterteilt in eine Säuglingsgruppe (A), mit der die kranken Säuglinge verglichen wurden und die zusammengefasste

Gruppe der älteren Kinder (> 1 Jahr, B bis D), mit der die gleichaltrigen kranken Kinder verglichen wurden. Da dabei zum Teil sehr kleine Gruppen von 1 bis 3 Kindern entstanden, konnte eine statistische Gruppenerfassung in diesen Fällen nicht durchgeführt werden, weshalb die Gruppen dann nur über ihre Mittelwerte verglichen wurden.

4.2.2 Subtotale Zottenatrophie der Dünndarmschleimhaut

Bei 11 Kindern konnte als Ursache der Gedeihstörung eine subtotale Zottenatrophie der Dünndarmschleimhaut histologisch nachgewiesen werden. Bei 2 Kindern wurde ein Zusammenhang mit vorhandenen Grunderkrankungen (Ichthyosis vulgaris und Psoriasis) diskutiert, bei 9 Kindern konnte mit Sicherheit eine gluteninduzierte Sprue diagnostiziert werden. Die Gruppe wird deshalb vereinfacht als Zöliakie-Gruppe (Coe) bezeichnet.

Das Muster der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester war bei diesen Kindern nicht anders als bei gesunden Kindern, obwohl doch wegen der Zottenatrophie mit Rückresorptionsstörungen und in der Folge mit verstärkter bakterieller Dekonjugation bzw. Dehydroxylierung gerechnet werden mußte.

Signifikant vermehrt ($p < 0,05$) war allerdings im Gruppenmittel die Summe der Taurin-gekoppelten Gallensäuren-Sulfate in Relativ-Prozent der Gesamt-Gallensäuren-Sulfatester. Eine Konsequenz dieser relativen Erhöhung der Summe der T-GS-S war die Verminderung des Quotienten aus Glycin-gekoppelten Sulfatestern zu Taurin-gekoppelten Sulfatestern. Lag das Verhältnis bei der Kontrollgruppe bei 2,04:1, findet man bei der Zöliakie-Gruppe ein Verhältnis von 1,3:1. Die Verschiebung erreicht jedoch noch nicht das Signifikanzniveau ($p > 0,05$). Ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,05$) ist die in Abb.18 optisch ins Auge

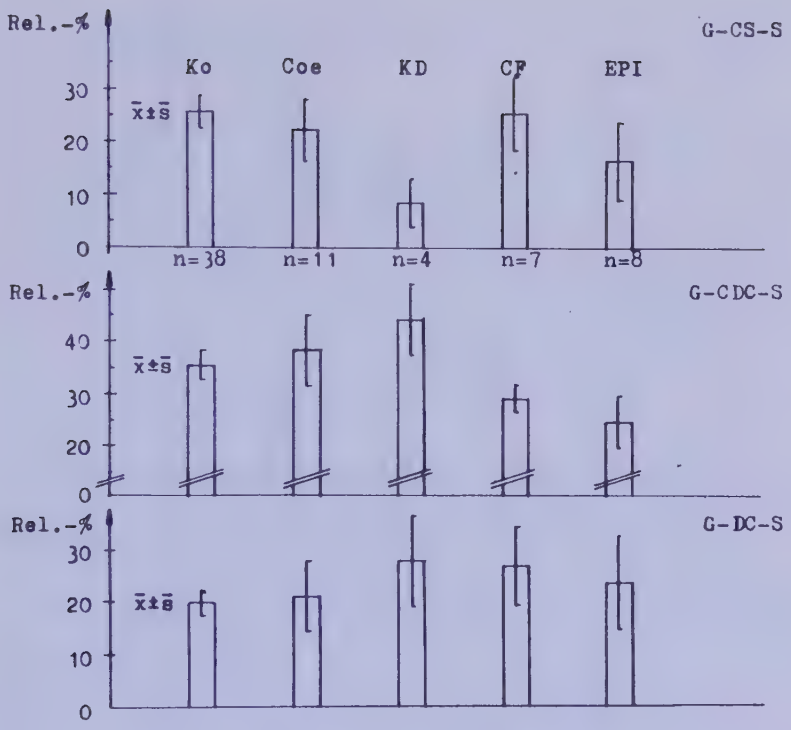


Abb. 17: Relative Häufigkeit einzelner Glycin-konj.GS-Sulfate an der Summe aller G-konj.GS-S im Vergleich der Kontrollgruppe (Ko) mit den Gruppen kranker Kinder. Angabe der Gruppenmittelwerte $\bar{x}$ mit der Standardfehlerbreite $\pm\bar{s}$.

oben Glycocholsäure-Sulfatester,
Mitte Glycochenodesoxycholsäure-Sulfatester,
unten Glycodesoxycholsäure-Sulfatester.
Coe-subtotale Zottenatrophie, KD-"Kurzdarm-Syndrom", CF-Mucoviszidose, EPI-exokrine Pankreas--Insuffizienz ohne CF.

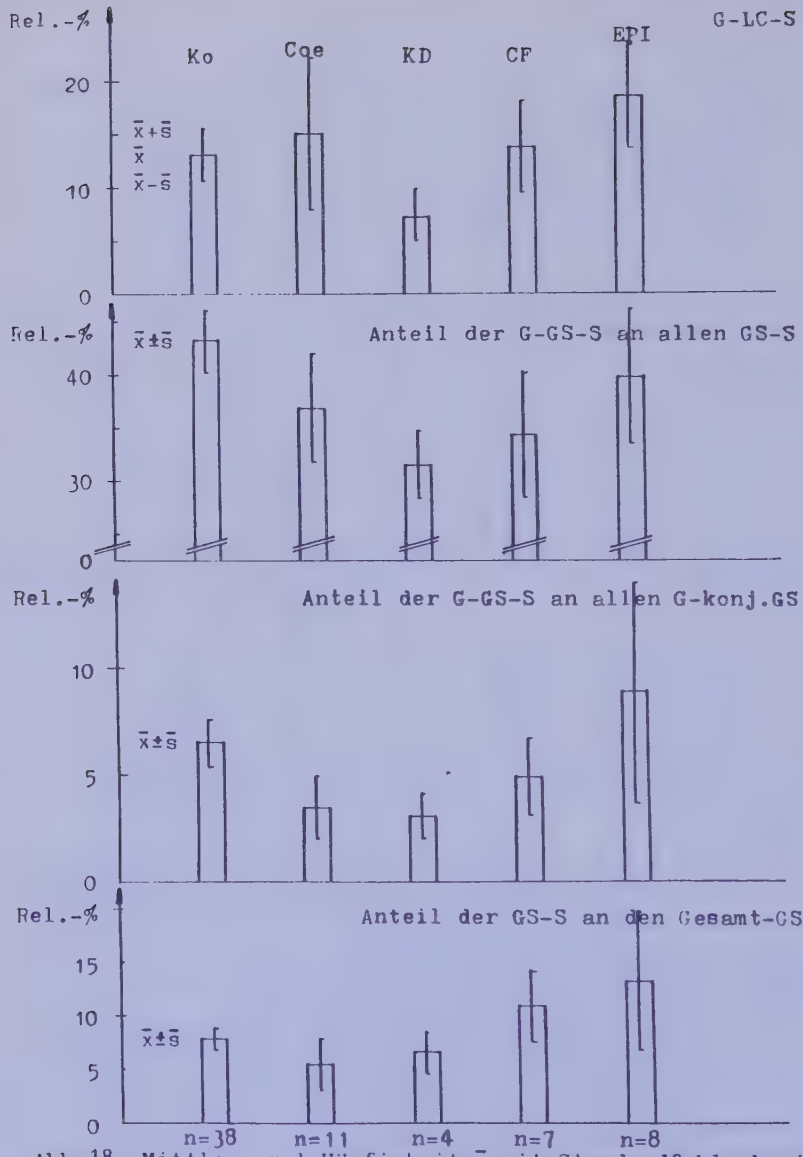


Abb.18: Mittlere rel.Häufigkeit $\bar{x}$ mit Standardfehlerbreite $\pm\bar{s}$
oben des G-LC-S an den gesamten G-konj.GS-Sulfaten,
2.v.o. der Glycin-konj.GS-Sulfaten an den Gesamt-GS-Sulfaten,
3.v.o. der G-konj.GS-S an allen G-konj.Gallensäuren,
4.v.o. der GS-Sulfatester an den Gesamt-Gallensäuren,
- Vergleich Kontrollgruppe - Gruppen kranker Kinder.
(Abkürzungsverzeichnis s.vorige Abbildungen)

fallende Verminderung der Summe der Glycin-gekoppelten Gallensäuren-Sulfate in Relativ-Prozent der Gesamt-Glycine.

Geradezu paradox verhalten sich die G-UD-S bei der Zöliakie-Gruppe im Vergleich zu den Normalkollektiven: Die beiden Säuglinge hatten mit durchschnittlich 15,3% G-UD-S einen höheren Prozentsatz dieser Gallensäure als das Mittel der älteren Kinder (B bis D), während die gesunden Säuglinge einen durchschnittlichen Prozentsatz von 6,25 hatten! Die älteren Zöliakie-kranken Kinder hatten dagegen mit 1,34% einen signifikant niedrigeren Anteil an G-UD-S, als ihre gesunden Altersgenossen ($p < 0,02$).

Auch bei den T-DC-S weisen die beiden an Zöliakie erkrankten Säuglinge mit $\bar{x}$ = 11,95% deutlich mehr DC auf als die gesunden Säuglinge mit durchschnittlich 6,25% und liegen damit im Normbereich der älteren Kinder (>1 Jahr). In dieser Altersgruppe (B bis D) findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden und kranken Kindern.

4.2.3 Patienten mit "Kurzdarm-Syndrom"

4 Kinder mit "Kurzdarm-Syndrom", d.h. einem Zustand nach subtotaler Dünndarmresektion, wurden jahrelang überwacht und zum Teil wurde mehrfach ein Sekretin-Pankreozymin-Test durchgeführt. Bei 2 Kindern war die Operation wegen einer Enteritis necroticans, einmal wegen einer ausgedehnten Dünndarmatresie und einmal wegen eines Volvulus erforderlich geworden. Bei der Operation konnten nur zwischen 22 und 53 cm Dünndarm erhalten werden, die End-zu-End mit den distalen Darmabschnitten verbunden wurden. Bei 3 von 4 Kindern konnte die Bauhin'sche Klappe nicht erhalten werden.

Bei dieser Gruppe ist die Summe der Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatester in Relation zu den gesamten Glycin-konjugierten Gallensäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) vermindert.
Bei der entsprechenden Gruppe der Taurine erscheint dagegen die Summe der Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatester in Relation zu den gesamten Taurin-konjugierten Gallensäuren bei der Kurzdarm-Gruppe im oberen Vertrauensbereich der Norm.

Der Quotient aus Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfaten zu Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfaten (G/T) war infolgedessen erniedrigt auf 1,24:1, gegenüber 2,04:1 bei der Kontrollgruppe. Auch hier war aber die Veränderung noch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die G-UD-S kommen bei den Kurzdarm-Kindern in beiden Altersgruppen zu einem relativ höheren Prozentsatz vor ($\bar{x}_A$ = 9,34%, $\bar{x}_{B-D}$ = 16,4%) als bei den gleichaltrigen gesunden Kindern ($\bar{x}_A$ = 6,25%, $\bar{x}_{A-D}$ = 13,52%). Wegen der kleinen Zahl der Patienten kann man dabei allenfalls eine Tendenz der vermehrten UD-S-Bildung erkennen. Diese Tendenz ist auch bei der Gruppe der mit Taurin konjugierten UD-S zu finden, die zu durchschnittlich 7,67% vorkommt, bei der Kontrollgruppe aber nur zu 3,25% gefunden wurde, was allerdings noch kein signifikanter Unterschied ist ($p > 0,05$).

Bei den T-DC-S verhalten sich die Ergebnisse der Kinder der Kurzdarm-Gruppe wie die der gesunden Kinder: Bei den Säuglingen findet sich wenig ($\bar{x}$ =1,40%), bei den älteren Kindern deutlich mehr ($\bar{x}$ = 21,38%) T-DC-S.

Bei allen übrigen konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern zeigte sich keine Verschiebung des Gallensäuren-Musters im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.2.4 Exokrine Pankreasinsuffizienz

4.2.4.1 Mukoviszidose (zystische Pankreasfibrose)

Bei 7 Kindern mit zystischer Pankreasfibrose (CF) konnte ein Sekretin-Pankreozymin-Test durchgeführt werden. Bei dieser Gruppe ist die Sulfatierungsrate der Taurin-gekoppelten Gallensäuren signifikant ($p < 0,05$) erhöht, gegenüber der Kontrollgruppe. Während bei der Mukoviszidose-Gruppe durchschnittlich 16,6% der Tauro-Gallensäuren als Sulfatester vorliegen, liegt die Norm der gesunden Kinder im Mittel bei 5,6%. Die Glycin-konjugierten GS-S waren dagegen in Relation zu den gesamten Glycin-konjugierten Gallensäuren etwas geringer vertreten, die Werte lagen aber noch im unteren Normbereich. Die Gesamt-Sulfatester in Relation zu den gesamten Gallensäuren (Summe aller Sulfate in Prozent der Summe der Gallensäuren) waren durch das Zusammenspiel der genannten Faktoren zwar erhöht, statistisch erreicht diese Erhöhung aber nicht die Signifikanzgrenze von $p < 0,05$.

Bei der Mukoviszidose-Gruppe lag der Quotient Glycin-gekoppelte GS-S zu Taurin-gekoppelte GS-S mit 1,19:1 ebenfalls deutlich niedriger aIs bei der Kontrollgruppe (2,04:1). Aber auch hier wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p > 0,05$). Der einzige mit CF untersuchte Säugling wies einen mit 33% weit über der Norm der Säuglinge ($\bar{x}$ = 1,49%) liegenden Prozentsatz an G-UD-S auf. Bei den 6 übrigen, älteren Kinder der CF-Gruppe hingegen ließ sich nur außerordentlich wenig G-UD-S nachweisen, das Mittel lag mit 0,67% hochsignifikant ($p < 0,01$) unter dem Durchschnitt der Gruppe der gesunden Kinder ($\bar{x}_{B-D}$ = 8,36%).

Bei den T-DC-S fiel der CF-Säugling mit 0% gegenüber durchschnittlich 6,25% der gesunden Säuglinge aus dem Rahmen. Die älteren an Mukoviszidose erkrankten Kinder (B-D) hatten dagegen mit 14,75% eine, verglichen mit der Kontrollgruppe ($\bar{x}_{B-D}$= 13,52%), normale Häufigkeit dieses

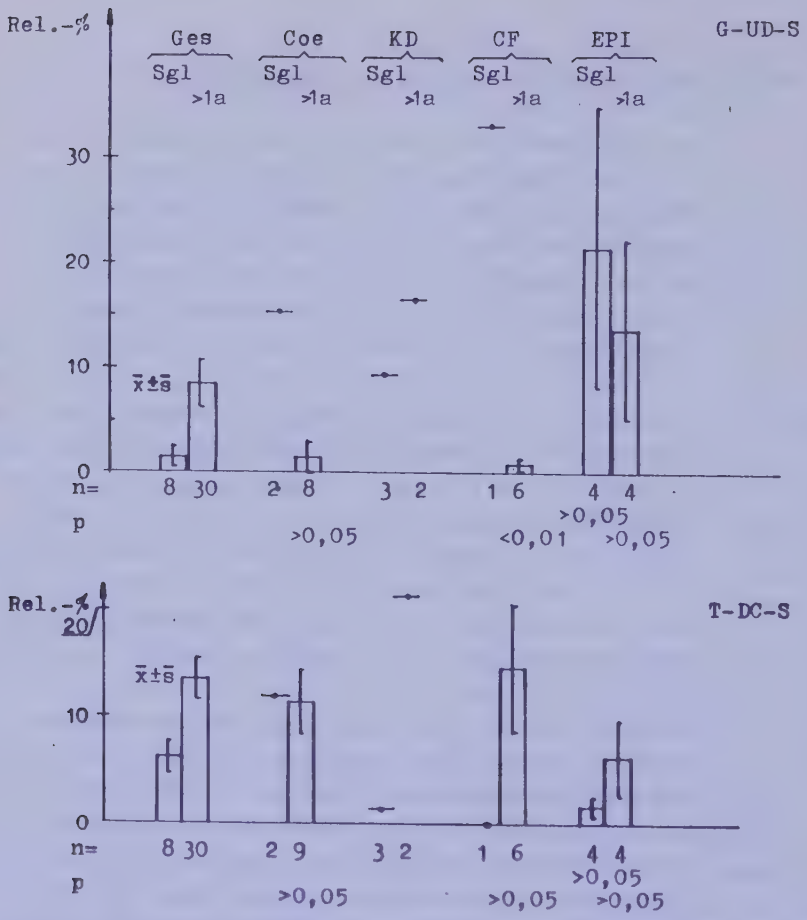


Abb.19: Mittlere rel.Häufigkeit mit Standardfehlerbreite ($\bar{x}\pm\bar{s}$)
oben des G-UD-S an allen Glycin-konj.GS-Sulfaten,
unten des T-DC-S an allen Taurin-konj.GS-Sulfaten,
im Vergleich der gesunden Kinder (Ges - A=Säuglinge, B-D=Kontrollgruppe ohne Säuglinge) mit den Gruppen erkrankter Kinder. Bei den Gesunden unterschieden sich Säuglinge und ältere Kinder bei beiden GS-S signifikant ($p<0,01$). Bei einer Gruppengröße bis 3 Kinder wurde nur das arithmetische Mittel bestimmt. Coe-subtotale Zottenatrophie, KD-"Kurzdarm-Syndrom", CF-Mucoviszidose, EPI-exokrine Pankreas-Insuffizienz ohne CF, Sgl-kranke Säuglinge (verglichen mit A), >1a-kranke Kinder (älter als 1 Jahr), vgl.mit B-D.

Gallensäuren-Sulfatesters.

Die prozentuale Verteilung der übrigen Gallensäuren war im Vergleich zur Kontrollgruppe unauffällig.

4.2.4.2 Kinder mit exokriner Pankreasinsuffizienz ohne Mukoviszidose (EPI)

Bei einer weiteren Gruppe von 8 Kindern, bei denen der Sekretin-Pankreozymin-Test durchgeführt wurde, wurde eine exokrine Pankreasinsuffizienz nachgewiesen, ohne daß sich Hinweise auf das Vorliegen einer Mukoviszidose fanden.

Bei dieser Gruppe war keine der untersuchten Gallensäuren statistisch signifikant erniedrigt oder erhöht. Das Muster der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester glich dem des Normalkollektivs.

Bei dieser inhomogenen Gruppe, es waren sowohl Patienten mit totaler als auch partieller Pankreasinsuffizienz vertreten, fiel die relativ breite Streuung der Sulfatierungsrate der Gallensäuren auf. Liegt die durchschnittliche Häufigkeit der Sulfatester an den gesamten Gallensäuren bei ca. 7,7%, lag bei dieser Gruppe der Mittelwert bei 13,3% [range ($\bar{x} \pm \bar{s}$): 6,9- 19,8%]. Beim Vergleich der absoluten Konzentrationen ist interessant, daß gerade bei den Patienten mit relativ hohen Mengen gekoppelter Gallensäuren der prozentuale Anteil der gekoppelten Gallensäuren-Sulfate niedrig war. Ein festes Verhältnis gekoppelter Gallensäuren zu gekoppelten Gallensäuren-Sulfatestern war also nicht vorhanden.

Der Quotient G-GS-S/T-GS-S lag mit 1,98:1 im Normbereich ($\bar{x}_{A-D}$ = 2,04:1). Bei den Säuglingen dieser Krankheitsgruppe war deutlich mehr G-UD-S ($\bar{x}$ = 21,33%) nachweisbar, als bei den gesunden Säuglingen ($\bar{x}_A$ = 1,48%), dennoch ist dieser Unterschied wegen der breiten Streuung bei den Kindern mit

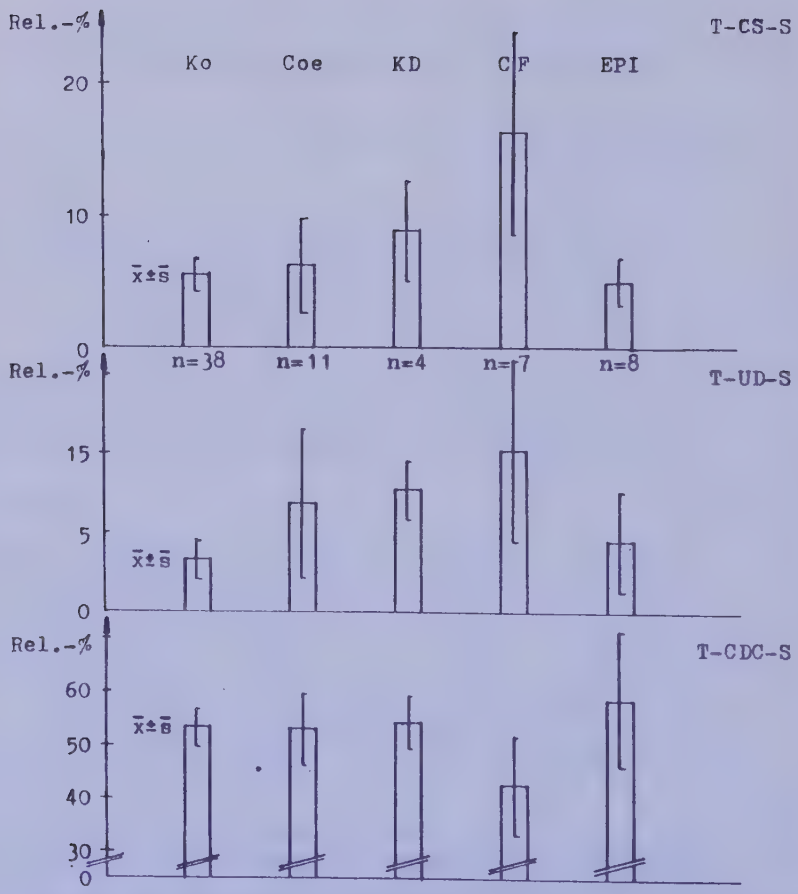


Abb. 20 ; Rel.Häufigkeit einzelner Taurin-konj.GS-Sulfate an der Summe aller T-konj.GS-S im Vergleich Kontrollgruppe (Ko) - Gruppen kranker Kinder. Angabe der Gruppenmittelwerte $\bar{x}$ mit Standardfehlerbreite $\pm\bar{s}$.

oben Taurocholsäure-Sulfatester,
Mitte Tauroursodesoxycholsäure-Sulfatester,
unten Taurochenodesoxycholsäure-Sulfatester.
Coe-subtotale Zottenatrophie, KD-"Kurzdarm-Syndrom", CF-Mucoviscidose, EPI-exokrine Pankreas-Insuffizienz ohne CF.

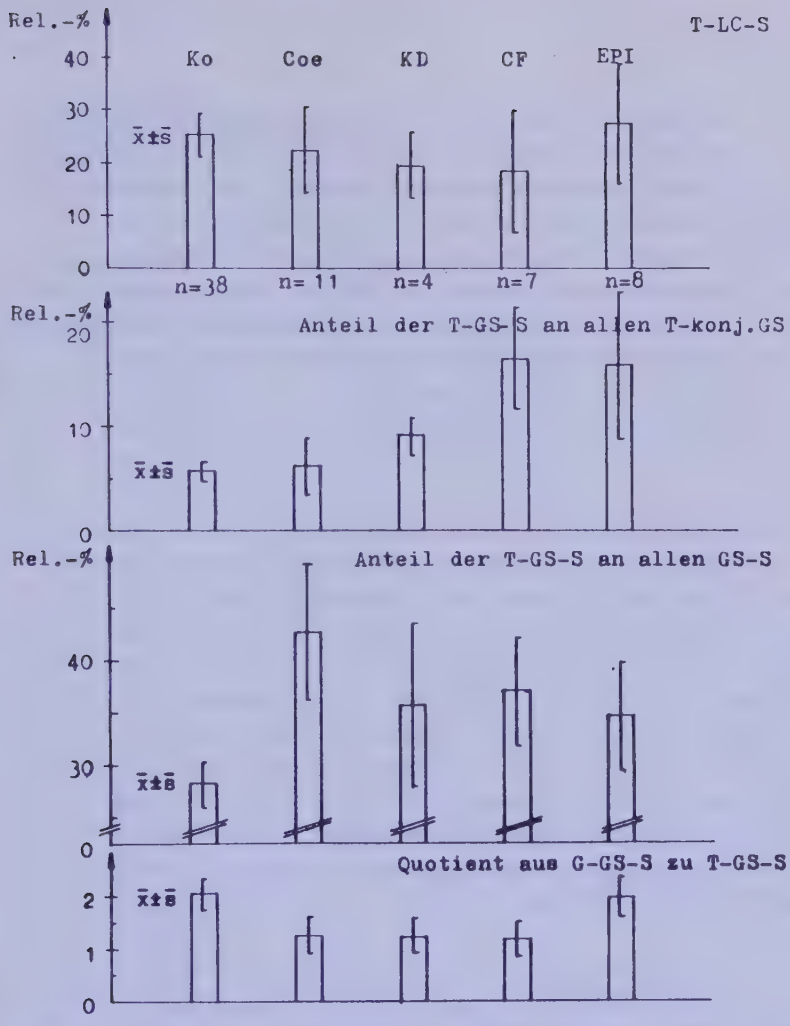


Abb. 21: Mittl.rel.Häufigkeit $\bar{x}$ mit Standardfehlerbreite $\pm\bar{s}$
oben des Taurolithocholsäure-Sulfatesters an der Summe der Taurin-konj.GS-Sulfatester,
2.v.o. der Taurin-konj.GS-Sulfate an den T-konj.Gallensäuren,
3.v.o. der T-konj.GS-Sulfate an allen Gallensäurensulfaten,
unten des Quotienten aus Glycin- zu Taurin-konj.GS-Sulfaten,
im Vergleich: Kontrollgruppe - Gruppen kranker Kinder.
Coe - Subtotale Zottenatrophie, KD -"Kurzdarm-Syndrom", CF - Mucoviscidose, EPI - exokrine Pankreas-Insuffizienz ohne CF.

EPI statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Auch bei den älteren erkrankten Kindern war kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (B - D) nachweisbar.

Sowohl bei den Säuglingen, als auch bei der Gruppe der älteren Kinder findet sich bei EPI eine relative Verminderung der T-DC-S, die aber gegenüber den Kontrollgruppen der gesunden Kinder nicht signifikant ist.

5. Diskussion

5.1. Auswertungsmethodik

Zur Beschreibung von "Mustern" hat sich, wie z. B. auch bei der Auswertung von Eiweiß-Elektrophoresen, die Erfassung der verschiedenen Substanzen in Relativ-Prozent bewährt, d.h. die Konzentration der einzelnen Gallensäuren-Sulfate wurden addiert, die Summe = 100% gesetzt und die Einzelsäure dann als Anteil der Summe in Relativ-Prozent ausgedrückt. Diese Methode zur Auswertung von Gallensäuren-Mustern wird u. a. von Igimi und von Eyssen et al. vorgeschlagen (28,41).

Der Vorteil dieser Angabe liegt in der Umgehung von Fehlermöglichkeiten, die durch Imponderabilien bei der Duodenalsaftabnahme einfließen. So ist es zum Beispiel trotz aller Bemühungen möglich, daß sich ein wenig Magensaft mit dem gesammelten Duodenalsaft mischt. Die Konzentration der Gallensäuren-Sulfate im Duodenalsaft wird somit vermindert. Es ist auch vorstellbar, daß trotz dauernder Absaugung des Duodenalsaftes eine kleine Menge an der ungeschickt liegenden Sondenspitze vorbei in distalere Darmabschnitte "entwischt" und damit die absolute Erfassung von Gallensäuren-Sulfaten, z. B. in Gallensäuren-Sulfate pro Kilogramm Körpergewicht unmöglich macht.

Die Störungskriterien wiegen bei der Erfassung der gekoppelten Gallensäuren-Sulfate schwerer, als z. B. bei Glycin-gekoppelten Gallensäuren, die im normalen Duodenalsaft viel höher konzentriert und damit nicht so störungsanfällig vorliegen. Eine Verdünnung des Duodenalsaftes kann dagegen die Gallensäuren-Sulfat-Konzentration im Duodenalsaft, die sich häufig im Bereich von wenigen nmol/ml bewegt,unter die Nachweisbarkeitsgrenze drücken.

Trotz der beschriebenen Fehlermöglichkeiten wird sich das Muster der Gallensäuren, ausgedrückt in Relativ-

prozent, untereinander nicht oder nur sehr wenig verändern, wenn man davon ausgeht, daß der sezernierte Gallensaft diese Gallensäuren homogen verteilt enthält.

5.2. Gesunde Kinder

Bei der Durchsicht der Ergebnisse überraschten die geringen Unterschiede in der relativen Verteilung der verschiedenen Gallensäuren-Sulfatester bei den 4 Altersgruppen gesunder Kinder. Das betrifft sowohl die isolierte vergleichende Betrachtung der Gruppen der mit einer bestimmten Aminosäure konjugierten Gallensäuren-Sulfatester, als auch die Relation der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester zu den Gesamt-Gallensäuren. Auch die Verteilung der Sulfatester innerhalb einer "Konjugationsgruppe" (z.B. der Gruppe aller mit Taurin konjugierten GS-S) wies nur geringe Schwankungsbreiten auf. Untersuchungen des Gallensäurenmusters wurden bisher meist nur mit freien und konjugierten Gallensäuren durchgeführt, die Sulfate wurden allenfalls als eine Untergruppe in ihrer Gesamtheit bestimmt.

Die durchschnittliche Veresterung der Gallensäuren mit Schwefelsäure belief sich bei dieser Untersuchung bei gesunden Kindern auf im Mittel 7,7%. Eine Altersabhängigkeit konnte nicht festgestellt werden, die Fähigkeit der Säuglingsleber zur Sulfatierung von Gallensäuren entspricht offensichtlich schon der älterer Kinder.
In der Literatur wird für Galle der prozentuale Anteil der Sulfate an den Gallensäuren bei Gesunden zwischen 2,1 und 10% angegeben (51, 60, 62, 73). Demnach gibt es eine relativ konstante Sulfatester-Quote bei gesunden Kindern. Bei Hepatitis-Patienten und Zirrhotikern wurden dagegen nur Spuren bzw. ca. 0,5% Gallensäuren-Sulfatester im Gallensaft gefunden (14, 52). Dagegen waren bei diesen Patienten die GS-S im Urin vermehrt. Konjugierte Gallen-

säuren-Sulfate werden im Darmsaft bei funktionierendem enterohepatischen Kreislauf entweder aktiv rückresorbiert, oder bakteriell dekonjugiert und danach per diffusionem im Colon aufgenommen. Für die Ausscheidung der konjugierten Gallensäuren-Sulfate aus der Leberzelle in die Galle kann eine ähnliche Schranke postuliert werden: Das polare Molekül muß aktiv in die Galle ausgeschieden werden. Ist der Stoffwechsel der Leber bei Hepatitis gestört, vermindert sich der aktive Transport und damit die Konzentration der GS-S in der Galle. Gleichzeitig steigt die Konzentration der GS-S im Blut aufgrund der durch die Entzündung gestörten Blut-Leberzell-Schranke, womit eine Erhöhung der GS-S-Konzentration im Urin einhergeht, da GS-S um bis zu 2 Zehnerpotenzen besser wasserlöslich sind als ihre nicht veresterten Moleküle (3, 46, 72). Diese Störung des hepatozellulären Transportmechanismus könnte somit die unterschiedlichen Ergebnisse bei Gesunden und bei Patienten, die an entzündlichen Lebererkrankungen leiden, erklären.

Der in dieser Arbeit erhaltene Prozentsatz der Veresterung von Gallensäuren mit Schwefelsäure entspricht somit den in der Literatur angegebenen Werten.

Das Verhältnis von Glycin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern zu Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern (G/T) stellte sich bei unseren Untersuchungen ebenfalls als altersunabhängig heraus. Im Mittel aller gesunden Kinder ergab sich eine Relation von 2,04:1. Die Säuglingsgruppe lag mit einem durchschnittlichen Wert von 1,81:1 zwar deutlich niedriger, der Unterschied war aber nicht signifikant. Die Säuglingsgruppe umfasste 8 Patienten bis zum Alter von 13 Monaten. Wurden die 5 Kinder bis 7 Monate als Gruppe zusammengefasst, ergab

sich ein Wert von 1,7:1, der das Signifikanzniveau ($p < 0,05$) noch immer nicht erreichte. An diesen Werten war aber die Tendenz zu erkennen, daß bei älteren Kindern die Konjugation mit Taurin im Vergleich zum Neugeborenen immer mehr in den Hintergrund trat. Diese Beobachtung findet in der Literatur ihre Bestätigung, wo ein konstantes Verhältnis von 2:1 bis 3:1 bei älteren Kindern beschrieben wird (16, 23, 57, 60). Dagegen wird bei Neugeborenen eine deutliche Vermehrung der Taurin-Konjugate gegenüber den Glycin-Konjugaten beschrieben: Bei ihnen wurden doppelt so hohe Prozentsätze an T-GS gefunden wie bei ihren Müttern (16). Andererseits konnte bewiesen werden, daß ein vermehrtes Angebot von Taurin in der Nahrung bei Erwachsenen zu einem Verhältnis G:T von 1:24 führte, d.h., daß 96% der konjugierten Gallensäuren Taurin-gekoppelt waren! Die Konjugation von Gallensäuren beim Menschen scheint demnach von folgenden Faktoren abzuhängen:

a) Vom Reifungsgrad der Leber (Säuglingsleber konjugiert häufiger mit Taurin als die der Mutter).

b) Vom Nahrungsangebot (16, 23, 57).

Die Konstanz des Verhältnisses G:T spricht für ein konstantes Nahrungsangebot von Taurin. Bemerkenswert ist auch, daß die Veresterung der konjugierten Gallensäure mit Schwefelsäure das Verhältnis G:T nicht tangiert.

Da sekundäre Gallensäuren durch bakterielle Dehydroxylierung primärer Gallensäuren im terminalen Ileum oder Colon entstehen, ist zu erwarten, daß bei Säuglingen, bei denen sich die Darmflora erst langsam entwickelt, keine sekundären Gallensäuren gefunden werden. Für die DC konnte diese Hypothese untermauert werden durch Arbeiten, in denen DC erst bei Kindern gefunden wurden, die älter als durchschnittlich 1 Jahr waren (25, 30, 60, 62).

Interessant ist auch, daß DC bei Ileostoma-Patienten, die ebenfalls keine bedeutende Keimbesiedelung des Dünndarms haben, nicht gefunden wurde (20, 23, 50).
In der vorliegenden Arbeit ergaben sich auch für Sulfatester Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Hypothese: Die G-DC-S lagen bei unserer Säuglingsgruppe (bis 13 Monate) im unteren Normbereich, die T-DC-S waren gegenüber der Gruppe der älteren Kinder (B - D) hochsignifikant erniedrigt ($p < 0,01$). Das Vorkommen der zweiten sekundären Gallensäure (Lithocholsäure), die bei Neugeborenen und Kleinkindern wiederholt nachgewiesen wurde, scheint der Hypothese jedoch zu widersprechen (25, 30, 60). Auch in der vorliegenden Untersuchung waren die konjugierten LC-S in der Säuglingsgruppe gegenüber den Gruppen älterer Kinder nicht deutlich erniedrigt. Neben der bakteriellen Entstehung im Darm existiert möglicherweise noch eine Synthesemöglichkeit durch die Leber. Dann wäre allerdings zu vermuten, daß die LC-Konzentration nach der bakteriellen Besiedelung des Darms ansteigt. Hierfür fanden sich jedoch weder in der vorliegenden Arbeit, noch in der Literatur Anhaltspunkte. Möglicherweise wird die LC-Produktion der Leber nach Beginn der bakteriellen Entstehung von LC im Darm durch einen negativen feed-back-Mechanismus, den üblichen Weg der Kontrolle der Gallensäure-Synthese gebremst (56). Es wäre auch denkbar, daß die Leber im Laufe ihrer Reifung im Säuglingsalter diesen alternativen Syntheseweg nicht mehr beschreitet. Bei Patienten mit Leberzellschaden wurde ein erhöhter LC-Spiegel im Serum festgestellt. Liegt hier ein Rückgriff auf Synthesemöglichkeiten vor, die sonst nicht genützt werden (63)? Oder ist diese Veränderung nur eine Folge der bei starker Leberzellschädigung bei schwerer Hepatitis beobachteten Vermehrung der CDC - der primären Gallensäure der LC (53)? In Tierversuchen wurde die hepatotoxische Wirkung von LC beobachtet (46). Diese Beobachtung wurde zunächst auch auf den Menschen übertragen und man interpretierte die relativ hohe Veresterung von LC mit Schwefelsäure

teleologisch als Versuch, der Entgiftung und vermehrten Ausscheidung auch über die Nieren (39, 72). In neueren Arbeiten wurde diese Hepatotoxizität beim Menschen nicht bestätigt, überdies nachgewiesen, daß die Ausscheidung von intravenös applizierter LC vollständig über die Galle erfolgt (8, 17, 20). Eine andere Erklärung der hohen Sulfatierungsrate der LC könnte in ihrem Löslichkeitsverhalten zu finden sein: LC ist bei Körpertemperatur und beim physiologischen pH der Galle kaum löslich (17). Durch die Konjugation mit einer Aminosäure wird die Löslichkeit etwas gebessert. Kommt eine zweite polare Gruppe durch Veresterung mit Schwefelsäure hinzu, steigt sie beträchtlich. Umgekehrt wird durch diese polaren Gruppen die Resorption erschwert, da aktiver Transport erforderlich wird und die passive Rückdiffusion aufgrund der hydrophilen, polaren Reste nicht möglich ist (33). Erst nach bakterieller Abspaltung der polaren Anteile des T-LC-S-Moleküls wird eine Diffusion möglich.
Die Mono-Hydroxy-Gallensäuren werden so zu einem relativ hohen Prozentsatz ausgeschieden, was durchaus sinnvoll erscheint, da sie im Vergleich zu einer Tri-Hydroxy-Gallensäure eine niedrigere micellare Aktivität und damit geringere detergierende Eigenschaften haben.
Die biologische Wertigkeit bei der Emulgierung von Fetten ist damit niedriger anzusetzen. Der menschliche Körper scheint dieser Tatsache Rechnung zu tragen, indem er CS effektiver aktiv rückresorbiert als z. B. Di-Hydroxy-Gallensäuren (23). Wie aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu ersehen ist, kommen konjugierte LC-Sulfatester in allen Altersgruppen gesunder Kinder zu ungefähr gleichen Anteilen vor, während die konjugierten Sulfatester der ebenfalls sekundären DC altersabhängig und somit von der bakteriellen Besiedelung des Darmes abhängig zu sein scheinen.

Die UD als weitere Di-Hydroxy-Gallensäure wurde in den letzten 10 Jahren als normaler Bestandteil der Galle erkannt. Ihr Anteil an den freien und konjugierten Gallensäuren wird in der Literatur bei gesunden Patienten zwischen 1,0 und 8% angegeben (41, 60, 73). Bisher ist der Syntheseort und Syntheseweg für die UD noch nicht eindeutig geklärt. Vielleicht wird UD über eine Ketozwischenstufe aus Lithocholsäure gebildet. Auch eine sekundäre, bakterielle Bildung wird diskutiert. Bei den konjugierten GS-S ist die UD zu einem ähnlichen Prozentsatz vertreten, wie bei den nicht mit Schwefelsäure veresterten Gallensäuren, sie war bei den gesunden Kindern regelmäßig nachweisbar. Das signifikant ($p<0,01$) geringere Vorkommen von G-UD-S bei Säuglingen im Vergleich zu der Gruppe der älteren Kindern (B - D) läßt, ähnlich wie bei der sekundären DC, an eine Entstehung durch bakterielle Umwandlung denken. Der relativ hohe T-UD-S-Anteil bei Säuglingen scheint dieser These zu widersprechen. Bei genauerer Untersuchung fiel aber auf, daß bei beiden Gruppen von 5 untersuchten Säuglingen, die unter 7 Monate alt waren, in jeweils 4 Fällen keine konjugierte UD-S nachgewiesen werden konnten. Bei den älteren Säuglingen waren konjugierte UD-S dagegen zu über 80% nachweisbar, was als Hinweis für die Entstehung von UD erst nach der bakteriellen Besiedelung des Darms aufgefasst werden kann.

5.3. Kranke Kinder

5.3.1 Subtotale Zottenatrophie (Coe)

Da die Rückresorption von Gallensäuren zum größeren Teil, von polaren konjugierten oder gar von konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern ausschließlich über einen aktiven Transportmechanismus vonstatten geht, ist bei Patienten mit Malabsorption oder Maldigestion auch eine Störung der Gallensäuren-Rückresorption zu erwarten (23, 44, 48, 76).

Als Ursache dafür kommt sowohl die gestörte Resorption direkt als auch die sekundär beschleunigte Darmpassage in Betracht. Bei der Untersuchung des Gallensäurenmusters dieser Patientengruppe wäre aufgrund der verminderten Rückresorption ein Anstieg der sekundären Gallensäuren zu erwarten, da im distalen Ileum und im Colon vermehrt Gallensäuren zur bakteriellen Dekonjugation und Dehydroxylierung bereitstehen müßten. Bei den untersuchten Kindern dieser Gruppe unterschied sich das Muster der konjugierten GS-S entgegen den Erwartungen nicht vom Muster der Kontrollgruppen gesunder Kinder. Auch der Anteil der Sulfate an den Gesamt-Gallensäuren und der Anteil der sekundären Gallensäuren lag im Normbereich. Diese Beobachtungen wurden auch in der Literatur für freie und konjugierte Gallensäuren wiederholt beschrieben (49, 60, 77). Zur Erklärung wurde eine vermehrte funktionelle Kapazität des Endileums als Resorptionsort der Gallensäuren postuliert, da bei Zöliakie vorwiegend die proximalen Dünndarm-Bezirke betroffen sind (49,60). Andererseits wurde auch bei Kindern mit gesicherter Erkrankung des distalen Ileums ein normales Gallensäurenmuster und normalefäkale Gallensäuren-Ausscheidung gefunden (71, 77). Selbst die eindeutig geschädigte Schleimhaut bei Zöliakie-Patienten ist offensichtlich in der Lage, die aktive Leistung der Gallensäurenrückresorption aufrecht zu erhalten und damit den enterohepatischen Kreislauf zu unterhalten. Die Feststellung eines "ungestörten Musters" ist allerdings nur begrenzt aussagekräftig, da keine Aussagen über vorhandene Quantitäten gemacht werden. Wie bereits oben besprochen, deutet aber die Konstanz des Anteils der sekundären Gallensäuren darauf hin, daß der normale Ablauf von Sekretion und Reabsorption nicht gravierend gestört ist.

Bei der Zöliakie-Gruppe war der Anteil der Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfate an der Summe aller Sulfate im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Damit ergab sich auch die Änderung des Quotienten G:T, der bei der Kontrollgruppe bei 2,04:1 lag, auf 1,3:1. Dies kann ein Hinweis auf eine verstärkte bakterielle Aktivität im Intestinum und eine Rückresorptionsschwäche bei den erkrankten Kindern sein. Normalerweise werden ca. 20-40% der konjugierten Gallensäuren im Darm dekonjugiert, wobei der Pool der Glycin-konjugierten Gallensäuren täglich vollständig dekonjugiert wird, der Pool der Taurin-Konjugate nur zu einem Drittel (33, 39). Die Taurin-Konjugate scheinen somit resistenter gegen bakterielle Dekonjugation zu sein. Weiter wurde beschrieben, daß Taurin-konjugierte Gallensäuren besser und vollständiger rückresorbiert werden als Glycin-Konjugate (23). Durch eine verminderte Tansportkapazität bei Schleimhautatrophie ist so eine Verschiebung des Quotienten G:T zugunsten der Taurine erklärbar: Durch die bevorzugte Rückresorption der T-GS-S kommt es bei geringerer Transportkapazität zu einer längeren "Wartezeit" der G-GS-S als üblich und damit zu einer verstärkten bakteriellen Dekonjugation. Eine vermehrte Taurin-Konjugation der Sulfatester in der Leber muß ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Niessen konnte bei Zöliakie-Patienten eine Verschiebung des Quotienten Glycin-konjugierter Gallensäuren zu Taurin-konjugierter Gallensäuren allerdings nicht beobachten (60).

Die bei den älteren Kindern (B - D) dieser Gruppe signifikant verminderten G-UD-S scheinen der oben geäußerten These der bakteriellen Entstehung dieser Di-Hydroxy-Gallensäure zu widersprechen. Durch die postulierten veränderten Resorptionsbedingungen kommen andererseits bei dieser Gruppe, insbesondere für die Glycin-Konjugate, Faktoren, wie z. B. die Wasserlöslichkeit bei dem vorherrschenden pH ins Spiel, die hier nicht näher untersucht wurden.

5.3.2 Kinder nach ausgedehnten Darmresektionen (KD)

Auch bei dieser Gruppe überrascht die hohe Übereinstimmung des Musters der konjugierten Gallensäuren-Sulfate mit dem der Kontrollgruppe. Ähnlich wie bei der Zöliakie-Gruppe erwartet man bei diesen Kindern, die nur noch über 22 bis 56 cm Dünndarm verfügen, starke Störungen des Musters der konjugierten GS-S, insbesondere da GS normalerweise im distalen Dünndarm rückresorbiert werden. Die klinischen Symptome der Kinder sind nur relativ kurze Zeit nach der Operation so ausgeprägt, wie sie in der Literatur beschrieben werden, wo nach Resektion von mehr als 50 cm Ileum bei Erwachsenen schwere Gallensäuren-Malabsorption mit nachfolgenden chologenen Diarrhoen beobachtet wurden (8, 22, 23, 27, 36, 50, 70). Bei Kindern, die die Kurzdarm-Operation längere Zeit überleben, adaptiert der Darm offensichtlich durch vermehrte Zottenhypertrophie und Längenwachstum (6, 40, 45). Für nicht reseziertes Rest-Ileum konnte eine vermehrte Gallensäuren-Reabsorption nachgewiesen werden (23).

Auch bei dem Muster der Gallensäuren-Sulfate konnten schwerwiegende Veränderungen in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Allerdings war der Anteil der Summe aller Glycin-konjugierten Sulfatester an der Summe der gesamten Glycin-konjugierten Gallensäuren signifikant vermindert. Der Quotient G/T liegt wiederum, wie bei den Zöliakie-Kindern mit 1,2:1 deutlich niedriger als die Norm (2,0:1). Bei den nicht sulfatierten konjugierten Gallensäuren fand Niessen dagegen einen gegenüber der Norm von 1,9:1 erhöhten Quotienten von 6,7:1 bei diesen Patienten (60, 62). Hier gelten prinzipiell die gleichen Überlegungen, wie sie für den G/T-Quotienten bei den Zöliakie-Patienten dargelegt worden sind. Die Diskrepanz zwischen den Sulfatestern und den nicht sulfatierten konjugierten Gallensäuren muß ihre Ursache in der unterschiedlichen Löslichkeit der beiden Gruppen im Intestinum und dem aktiven Transport,

insbesondere von Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfatestern bzw. dem Diffusionsverhalten von konjugierten Gallensäuren haben (15, 21). Eine vermehrte Taurin-Konjugation in der Leber müßte sich auch auf das Verhältnis G/T bei nicht sulfatierten konjugierten Gallensäuren auswirken, wo aber genau der gegenteilige Effekt beobachtet wurde. Eine selektiv vermehrte Taurinkonjugation von Sulfatestern erscheint sehr unwahrscheinlich.

5.3.3.1 Mukoviszidose (CF)

Der Prozentsatz der Veresterung der Taurin-konugierten Gallensäuren mit Schwefelsäure ist bei der CF-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant vermehrt, während bei der gleichen Gruppe der Glycin-konjugierten Gallensäuren der Prozentsatz der Sulfatester im unteren Vertrauensbereich der Norm liegt. Bei Mukoviszidose kommt es durch die exokrine Pankreasinsuffizienz und damit durch den Mangel an Bicarbonat zu einer Ansäuerung des Duodenalinhalts (77). Taurin-konjugierte Gallensäuren haben einen niedrigeren pK als Glycin-konjugierte Gallensäuren. Bei einem niedrigeren intestinalen pH könnte es so zu vermehrten Diffusion der sonst nicht diffundierbaren Taurin-konjugierten Gallensäuren kommen (11). Niessen fand aber, daß bei an Mukoviszidose erkrankten Kindern die Taurin-Konjugation der Gallensäuren absolut abgenommen, das Verhältnis G/T sich zu Gunsten der Glycin-Konjugate verschoben hat (60). Eine verstärkte Rückdiffusion von Taurin-konjugierten Gallensäuren ist damit unwahrscheinlich. Vielmehr könnte dies darauf hinweisen, daß die Leber eine konstante Menge konjugierter rückresorbierter Gallensäuren sulfatiert, unabhängig vom Angebot. Bei insgesamt verminderter Rückresorption würde sich dann die Relation Taurin-konjugierter Gallensäuren zu Taurin-konjugierten Gallensäuren-Sulfaten zugunsten der Sulfatester verschieben.

Ein weiteres, interessantes Ergebnis findet sich bei der Relation Glycin-konjugierter zu Taurin-konjugierter Gallensäuren-Sulfatester: Während in der Literatur für die nicht sulfatierten Konjugate Werte zwischen 2,5:1 und 4,8:1 angegeben werden, fand sich bei den Sulfatestern erneut die gegenteilige Tendenz (35, 60, 78). Die Taurin-konjugierten Sulfatester waren im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ häufiger vertreten ($\bar{x}_{A-D}$ 1,19:1; Norm: 2,04:1), wie schon zuvor bei den Gruppen der Kurzdarm- und Zöliakie-Kindern. Bei Patienten mit Mukoviszidose sind in der Literatur vermehrte fäkale Gallensäurenverluste beschrieben (35, 77, 78). Bei erhöhten Verlusten Taurin-konjugierter Gallensäuren würde der Körper an Taurin verarmen. Der Grad der Konjugation mit Taurin hängt direkt von dessen Gehalt in der Nahrung ab (23). Taurine sind in der Mukoviszidose-Diät nicht vermehrt gegenüber normaler Nahrung. Gegen eine erhöhte Zufuhr spricht auch die in der Literatur beschriebene Verschiebung des G/T-Quotienten nicht sulfatierter Gallensäuren zugunsten von Glycin. Ursache für die Verschiebung des G/T-Quotienten bei den Sulfaten kann nur eine vermehrte Rückresorption von T-GS-S oder eine relativ vermehrte Veresterung der Taurin-Konjugate mit Schwefelsäure sein.

Bei dem einzigen untersuchten Säugling mit CF fand sich ein hoher Prozentsatz an G-UD-S, der, auch im Zusammenhang mit den älteren CF-Kindern, wohl als Fehlbestimmung angesehen werden muß. Bei den älteren Kindern (B - D) mit CF waren signifikant weniger G-UD-S nachweisbar, als bei der gleichaltrigen Kontrollgruppe. Die in der Literatur beschriebenen vermehrten Gallensäuren-Verluste lassen eine Verminderung der sekundären Gallensäuren-Anteile erwarten, da die Leber den vermehrten Gallensäurenverlust durch eine erhöhte Neusynthese an primären Gallensäuren auszugleichen versucht (58, 78). Die Verminderung der G-UD-S bei Mukoviszidose-kranken Kindern

scheint gegen eine primäre Entstehung von UD in der Leber zu sprechen, da bei einer primären Entstehung in der Leber ein konstanter Prozentsatz von UD am Gallensäurenmuster erwartet würde. Andererseits finden sich bei den Taurin-konjugierten UD-S keine erniedrigten Werte, die Ursodesoxycholsäure liegt dort eher bei einer breiten Streuung im oberen Normbereich. Auch die Anteile der sekundären Desoxycholsäure lagen bei beiden Konjugaten im Normbereich. Demnach läßt sich ein vermehrter Gallensäureverlust mit einer Verminderung der sekundären Gallensäuren durch diese Untersuchung bei Gallensäuren-Sulfaten nicht bestätigen.

5.3.3.2 Exokrine Pankreasinsuffizienz (EPI)

In dieser Gruppe waren Kinder mit partieller und kompletter Pankreasinsuffizienz zusammengefasst worden. Ein signifikanter Unterschied im Muster der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester zwischen den Gruppen gesunder und erkrankter Kinder konnte nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis überrascht nicht, muß man doch annehmen, daß bei einer isolierten Pankreasinsuffizienz die Leber an der Gallensäuren-Produktion und -Ausscheidung nicht gehindert wird. Auch Niessen fand bei seinen Untersuchungen kaum Abweichung im Gallensäurenmuster im Vergleich zur Kontrollgruppe (59, 61). Eine Änderung im Muster der konjugierten Gallensäuren-Sulfate wäre erst dann zu erwarten, wenn es im Rahmen der Pankreasinsuffizienz zu einer Behinderung des Gallenabflusses und damit zu Zeichen der Cholestase kommen würde. Sulfatester sind bei Cholestase im Urin und Serum, aber auch im Duodenalsaft erhöht (3, 14, 31, 47, 52, 60, 72). Die breite Streuung des Anteils der konjugierten Gallensäuren-Sulfatester an den Gesamt-Gallensäuren, die bei dieser Gruppe beobachtet wurde, mag durch eine mehr oder weniger starke Cholestase zu erklären sein: Durch entzündliche, oder später fibrotische Umwandlung im Pankreas kann es

zu einer Einengung des Choledochus und damit zu Abflußbehinderungen kommen. Möglich wäre auch eine sekundäre, z. B. entzündliche Schädigung der Leber und Gallenwege, die mit Cholestase-Zeichen einhergeht. Bei der unterschiedlich ausgeprägten Pankreasinsuffizienz der Patienten dieser Gruppe ist, je nach deren Ursache, auch eine mehr oder weniger starke Cholestase zu erwarten. Dadurch wäre die relativ breite Streuung des Sulfatanteils an den Gesamt-Gallensäuren bei dieser Gruppe erklärbar.

6. Zusammenfassung

Gallensäuren-Sulfatester wurden im Darmsaft im Rahmen eines Sekretin-Pankreozymin-Testes dünnschichtchromatographisch mit Hilfe eines Chromatogramm-Spektralphotometers untersucht. Bei gesunden Kindern verschiedener Altersgruppen wurde das Muster der Gallensäuren-Sulfatester bestimmt und mit dem Muster von Kindern verglichen, die an bestimmten gastrointestinalen Erkrankungen litten. Folgende Gallensäuren-Sulfate wurden jeweils als freie bzw. als Taurin- und Glycin-Konjugate untersucht: Chol-, Chenodesoxychol-, Desoxychol-, Ursodesoxychol- und Lithocholsäure. 4 Gruppen kranker Kinder wurden gebildet: Zöliakie, "Kurzdarm-Syndrom", exokrine Pankreasinsuffizienz mit und ohne Mukoviszidose. Der Anteil der Gallensäuren-Sulfatester an den Gesamt-Gallensäuren belief sich bei gesunden wie kranken Kindern auf 7,7%. Glycin-Konjugate waren bei den Gesunden zu 43%, Taurin-Konjugate und freie Gallensäuren-Sulfate zu jeweils ca. 28% vertreten. Eine Altersabhängigkeit des Musters war mit zwei Ausnahmen weder bei den gesunden, noch bei den erkrankten Kindern feststellbar. Schon bei Säuglingen konnten normale Prozentsätze des Sulfatesters der Lithocholsäure festgestellt werden, obwohl wegen der fehlenden bakteriellen Darmbesiedelung eine sekundäre Entstehung unwahrscheinlich ist; ein alternativer primärer Syntheseweg für die Säuglingsleber muß diskutiert werden.

Der Anteil der zweiten sekundären GS - Desoxycholsäure - war im ersten Lebensjahr besonders bei den Taurin-Konjugaten erniedrigt. Wie bei der Ursodesoxycholsäure,deren Entstehung bisher noch nicht eindeutig geklärt ist, zeichnet sich eine Altersabhängigkeit ab, die auf eine sekundäre bakterielle Entstehung hinweist. Das Verhältnis der Glycin- zu Taurin-konjugierten Sulfate wurde mit 2:1 altersunabhängig gefunden. Bei den kranken Kindern zeichnet sich eine Tendenz zu vermehrter Taurin-Veresterung der Sulfate ab.

Die Übereinstimmung des Musters der Gallensäurensulfate der gesunden und kranken Kinder überraschte, gingen die Erkrankungen doch mit einer beträchtlichen Verminderung der Resorptionsfläche bzw. Veränderung der intestinalen physiologischen Gegebenheiten einher.

Abkürzungen

GS	Gallensäure
CS	Cholsäure
CDC	Chenodesoxycholsäure
DC	Desoxycholsäure
Hyo	Hyodesoxycholsäure
LC	Lithocholsäure
UD	Ursodesoxycholsäure
UD	Ursodesoxycholsäure
GS-S	Gallensäuren-Sulfatester
G-GS	Glycin-konjugierte Gallensäure
T-GS	Taurin-konjugierte Gallensäure
analog z.B.:	
G-LC-S	Gluco-Lithocholsäure-Sulfatester
G-UD-S	Glyco-Ursodesoxycholsäure-Sulfatester
T-DC-S	Tauro-Desoxycholsäure-Sulfatester
DC-Platten	Dünnschichtchromatographie-Platten
µmol	Mikromol

Literaturverzeichnis

1. Back, P., Schuhmacher, H., Gerok, W.: Primäre Synthese von Monohydroxygallensäuren in der Leber. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 78, 1300-1303, 1972.
2. Back, P., Ross, K.: Identification of 3-hydroxy-5-cholenoic acid in human meconium. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 354, 83-89, 1973.
3. Back, P.: Gallensäurenstoffwechsel bei Cholestase. Verh.Dtsch.Ges.Inn. Med. 80, 415-418, 1974.
4. Back, P.: Evidence for bile salt glucuronides in cholestasis. In: Matern,S., Hackenschmidt, J., Back,P., Gerok, W.: Advances in bile acid research, 149-151, Stuttgart, 1974.
5. Batta, A.K., Salen, G., Shefer, S.: Thin-layer chromatography of conjugated bile acids. J. Chromatogr. 168, 557-561, 1979.
6. Bell, M.J., Lester, W.M., Schubert, W.K. Partin, J., Burke, J.: Massive small-bowel resection in an infant:Long-term management and intestinal adaption. J.Pediat.Surg. 8, 197-204, 1973.
7. Bloch, C.A., Watkins,J.B.: Determination of conjugated bile acids in human bile and duodenal fluid by reverse-phase high-performance liquid chromatography. J.Lipid Res. 19, 510-513, 1978.
8. Blum, A.L., Knoblauch, M.,Krejs, G.J., Brändli, H.H., Ammann, R.: Durchfall und Gallensäuren. Dtsch. med. Wschr. 99, 300-307, 1974.
9. Borgström, B.: Bile Salts - their physiological functions in the Gastrointestinal Tract. Acta med. scand. 196, 1-10, 1974.
10. Brühl, W., Schmidt, E.: Quantitative Bestimmung der nach Hydrolyse freigesetzten konjugierten Gallensäuren auf Dünnschichtchromatogrammen mit Spectrofotofluorimetrie. Z.Gastroenterologie 10, 40-43,1972.

11. Burke, V., Anderson, C.M.: The bacterial flora of the upper gastrointestinal tract in children both in health and disease. In: Anderson, C.M., Burke, V.: Paediactric gastroenterology, Oxford, 397-406, 1975.

12. Burstein, S., Lieberman , S.: Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures. J.Biol.Chem. 233, 331-335, 1958.

13. Burton, P., Harper, A.A., Howat, H.T., Scott, J.E., Varley, H.: The use uf cholecystokinin to test gall bladder function in man. GUT 1, 193-204, 1960.

14. Capocaccia, L., Attili, A.F.,Cantafora, A., Bracci, F., Paciscopi, L., Pouti, C., Pi'eche, U., Angelico, M.: Sulfated bile acis in serum, bile and urine of cirrhotic patients before and after portacaval anastomosis. Dig.Dis.Sci., 26, 513-517, 1981.

15. Carey, M.C., Wu, S.-F.J., Watkins, J.B.: Solution properties of sulfated monohydroxy bile salts. Biochim.Biophys. Acta 575, 16-26, 1979.

16. Challacombe, D.N., Edkins, S., Brown, G.A.: Duodenal bile acids in infancy. Arch.Dis.Child. 50, 837-843, 1975.

17. Cowen, A.E., Korman, M.G., Hofmann, A.F., Cass, O.W.: Metabolism of Lithocholate in healty man. Gastroenterology 69, 59-66, 1975.

18. Cronholm, T., Makino, I., Sjövall, J.: Steroid metabolism in rats given (1-$^2H_2$) ethanol. Oxidoreduction of isomeric 3-hydroxycholanoic acids and reduction of 3-oxo-4-cholenoic acids. Eur.J.Biochem. 26, 251-258, 1972.

19. Desnuelle, P.: Pancreatic lipase. Advanc. Enzymol. 23, 129-161. 1961.

20. Dew, M.J., Van Berge Henegouwen, G.P., Huybregts, A.W., Allan, R.N.: Hepatotoxic effect of bile acids in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 78, 1393-1401, 1980.

21. Dietschy, J.M.: Bile acids: Their absorption from the gastrointestinal tract and role during fat absorption. Verh. Dtsch.Ges.Inn.Med. 80, 399-407, 1974.

22. Dölle, W.: Malabsorptionssyndrom nach Dünndarmresektion. Dtsch.med.Wschr. 98, 1782-1783, 1973.

23. Dowling, R.H.: The enterohepatic circulation. Gastroenterology 62, 122-140, 1972.

24. Entenmann, A.: Untersuchung der Gallenfunktion bei Säuglingen und Kindern durch Analyse der Gallensäuren im Duodenalsaft. Inaugural-Dissertation, Tübingen 1976.

25. Erb, W.: Gallensäurenanalysen bei Neugeborenen. In: Back, P., Gerok, W.: Bile Acids in Human Diseases. Stuttgart 1972.

26. Ervard, E., Jansson, G.: Gas-liquid chromatographic determination of human fecal bile acids. J.Lipid Res. 9, 226-235, 1968.

27. Ewerth, S.: Postprandial serum concentration of individual bile acids in man. Influence of ileal resection. Scand. J.Gastroent. 17, 781-784, 1982.

28. Eyssen, H., Parmentiere, G., Compernolle, F., Boon, J., Eggermont, E.: Trihydroxycoprostanic acid in the duodenal fluid of two children with intrahepatic bile duct anomalies. Biochim. Biophys.Acta 273, 212-221, 1972.

29. Fehèr, T., Papp, J., Kazig, M.H.: Spectrofluorimetric determination of individual bile acis in biological fluids: duodenal content and bile. Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 376-380, 1973.

30. Finni, K., Similae, S., Koivisto, M., Kouvalainen, K.: Desoxycholic and sulpholithocholic acid concentrations in serum during infancy and childhood. Acta Paediat.Scand., 72, 215-218, 1983.

31. Fröhling, W., Stiehl, A.: Gallensäureglucuronide beim Menschen. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 81, 1293-1295, 1975.

32. Fromm, H., Thomas, P.J., Hofmann, A.F.: Sensitivity and specifity in tests of distal ileal function: A prospetive comparison of bile acid and vitamin B_{12} absorption in ileal resection patients. Gastroenterology 64, 1077-1085, 1973.

33. Fromm, H.,Hofmann, A.F.: The importance of bile acids in human diseases. In: Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde 37, 144-192, 1975.

34. Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, Teilband Statistik, 8. Aufl., Basel 1980.

35. Goodchild, M.C. Murphy, G.M., Howell, A.M., Nutter, S.A., Anderson, C.M.: Aspects of bile acid metabolism in cystic fibrosis. Arch.Dis.Child. 50, 769-778, 1975.

36. Hadorn, B.: Influence of bile acids on intestinal and pancreatic enzymes. In: Back, P., Gerok, W.: Bile acids in human diseases, Stuttgart, 1972.

37. Heaton, K.W.: Bile salts in health and disease. Edinburgh,London, 1972.

38. Hofmann, A.F.: Thin-layer chromatography of bile acids and their derivates. In: James, A.T., Morris, L.J.: New biological separations. Chapter 12, London, 1965.

39. Hofmann, A.F.: The enterohepatic circulation of bile acids in man. In: Stollermann, G.H. (Ed.): Advances in internal medicine, 21, 501-534, 1976.

40. Holschneider, A.M., Harms, K., Boehne, A., Bidlingmaier, F., Dewald, M.B.: Resorptionsstörungen und Gallensäureverlustsnydrom nach operativen Eingriffen am kindlichen Dünndarm. Bruns' Beitr.Klin.Chir. 221, 516-524, 1974.

41. Igimi, H.: Ursodesoxycholate - A common bile acid in gallbladder of japanese subjects. Life Sci. 18, 993-1000, 1976.

42. Jacobsen, J.G., Smith, L.H.: Biochemistry and physiology of taurine derivates. Physiol. Rev. 48, 424-511, 1968.

43. Kaplowitz, N., Javitt, N.B.: Quantitative analysis of unconjugated bile acids in duodenal fluid by densitometry after paper electrophoresis. J.Lipid Res. 14, 224-228, 1973.

44. Lack, L., Weimer, I.M.: Intestinal bile salt transport, structure-activity relationships and other properties. Amer.J.Physiol. 210, 1142-1152,1966.

45. Lehmann. O.J.:Das Verhalten von Gallensäuren in der Leber bei Schweinen nach subtotaler Dünndarmresektion Inaugural-Dissertation, Tübingen, 1977.

46. Leuschner, U., Czygan, P., Stiehl, A.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Toxizität von sulfatierter und nichtsulfatierter Lithocholsäure. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 81, 1311-1313, 1975.

47. Liersch, M., Stiehl, A.: Bildung von Gallensäuresulfatestern in perfundierten Rattenlebern nach Gallengangsverschluß. Z.Gastroenterologie 12, 131-134, 1974.

48. Low-Beer, T.S., Tyor, M.P., Lack,L.: Effect of sulfation of taurolithocholic acid and glycolithocholic acid on their intestinal transport. Gastroenterology 56, 721-726, 1969.

49. Low-Beer, T.S., Heaton, K.W., Pomare, E.W., Read. A.E.: The effect of coeliac disease upon bile salts. GUT 14, 204-208, 1973.

50. MacGregor, I.L., Wiley, Z.D., Sleisenger, M.H.: The role of bile acids in determining ileal flow rates in normal subjects and following ileostomy. Digestion 18, 192-200, 1978.

51. Makino, I., Nakagawa, S., Shinozaki, K., Mashimo, K.: Sulfated and Nonsulfated Bile Acid in Human Serum. Lipids 7, 750-752, 1972.

52. Makino, I., Hashimoto, H., Shinozaki, K., Yoshino, K., Nakagawa, S.: Sulfated and nonsulfated bile acids in urine, serum, and bile of patients with hepatobiliary diseases. Gastroenterology 68, 545-553, 1975.

53. Matern, S., Gerok, W.: Diagnostic value of serum bile acids. Acta Hepato-Gastroenterol. 26, 185-189, 1979.

54. Matsui, A., Psacharopoulos, H.T., Mowat, A.P., Portmann, B., Murphy G.M.: Radioimmunoassay of serum glycocholic acid, standard laboratory tests of liver function and liver biopsy findings: comparative study of children with liver disease. J.Clin.Pathol. 35, 1011-1017, 1982.

55. Mosbach, E.H.: Regulation of bile acid synthesis. In: Back, P., Gerok, W.: Bile acids in human diseases. Stuttgart, 1972.

56. Mosbach, E.H.: Regulation of bile acid synthesis. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 80, 393-399, 1974.

57. Murphy, G.M. Signer, E.: Bile acid metabolism in infants and children. GUT 15, 151-163, 1974.

58. Murphy, G.: Bile acid metabolism. In: Anderson, C.M., Burke, V.: Paediatric gastroenterology, 387-396, Oxford, 1975.

59. Niessen, K.H. Oßwald, P., Brügmann, G., Hartmann, F., Droste, E., Schmidt, K.: Untersuchung der Pankreas- und Gallenfunktion bei Säuglingen und Kindern. Z.Kinderheilk. 116, 291-304, 1974.

60. Niessen, K.-H.: Untersuchungen der Gallensäuren im Darmsaft bei Säuglingen und Kindern mit Malabsorptions- und Maldigestionssyndromen. Habilitationsschrift, Tübingen, 1977.

61. Niessen, K.-H.: Die Bedeutung der Gallensäurenbestimmung im Darmsaft für die Interpretation der Genese exokriner Pankreasinsuffizienzen im Säuglings- und Kindesalter. Mschr.Kinderheilk. 126, 343-345, 1978.

62. Niessen, K.-H.: Gallensäuren im Darmsekret von Säuglingen und Kindern. Normalwerte, Lognormalverteilung und Altersabhängigkeit der Gallensäurengesamtmenge sowie des Gallensäurenmusters. Mschr. Kinderheilk. 127, 29-36, 1979.

63. Ohlen, J., Richter, J., Neiss, Al, Drescher, M., Selmair, H.: Serumkonzentrationen von Glycocholsäure und Sulfoglyco-Lithocholsäure im Verlauf der akuten Hepatitis. Acta Med.Austriaca 7, 49-51, 1981.

64. Oßwald, P., Niessen, K.-H., Hartmann, F., Droste, E., Brügmann, G., Schmidt, K.: Untersuchung der Pankreas- und Gallenfunktion bei Säuglingen und Kindern. Z.Kinderheilk. 116, 281-290, 1974.

65. Palmer, R.H.: The formation of bile acid sulfates: A new pathway of bile acid metabolism in humans. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 58, 1047-1050, 1967.

66. Palmer, R.H., Bolt, M.G.: Bile acid sulfates. Synthesis of lithocholic acid sulfates and their identification in human bile. J. Lipid.Res. 12, 671-679, 1971.

67. Ponz de Leon, M., Loria, P., Carulli, N., Murphy, G.M. Dowling, R.H.: Intestinal solubization, absorption, pharmacokinetics and bioavailability of chenodesoxycholic acid. Eur.J.Clin.Invest. 10, 261-271, 1980.

68. Rick, W.: Der Sekretin-Pankreozymin-Test in der Diagnostik der Pankreasinsuffizienz. Internist 11, 110-115, 1970.

69. Roseleur, O.J., van Gent, C.M.: Alkaline and enzymatic hydrolysis of conjugated bile acids. Clin.Chim. Acta 66, 269-272, 1976.

70. Sickinger, K.: Die Behandlung der chologenen Diarrhoe und Steatorrhoe des enteralen Gallensäureverlustsyndroms mit Cholestyramin und mittelkettigen Triglyceriden. Dtsch.med.Wschr. 94, 1151-1157, 1969.

71. Siegel, J.H., Barnes, S., Morris, J.S.: Bile acids in liver disease associated with inflammatory bowel disease. Digestion 15, 469-481, 1977.

72. Stiehl, A.: Bile salt sulfates in intra- and extrahepatic cholestasis. In: Back, P., Gerok, W.: Bile acids in human diseases, 73-77, Stuttgart 1972.

73. Summerfield, J.A., Cullen, J., Barnes, S., Billing, B.H.: Evidence for renal control of urinary excretion of bile acids and bile acid sulfates in the cholestatic syndrome. Clin.Sci.Mol.Med. 52, 51-65, 1977.

74. Tausch, W.: Quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen durch direkte Photometrie. Meßtechnik 80, 38-44, 1972.

75. Van den Ende, A.: The quantitation of bile acids on TLC by direct scanning fluorimetry. In: Back, P., Gerok, W.: Bile acids in human diseases. Stuttgart, 1972.

76. Wanitschke, R., Freiberger, T., Nell, G., Ewe, K.: Untersuchungen zur Durchlässigkeit der Colonschleimhaut unter Einfluß von Desoxycholat. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med. 83, 446-448, 1977.

77. Weber, A.M., Roy,C.C., Morin, C.L., Lasalle, R.: Malabsorption of bile acids in children with cystic fibrosis. N.Engl.J.Med. 289, 1001-1005, 1973.

78. Weber, A.M. Roy, C.C., Lepage, G., Chartrand, L., Lasalle, R.: Interruption of the enterohepatic circulation of bile acids in cystic fibrosis. Digestion 13, 189-190, 1975.

79. Williams, C.N.: Bile acid metabolism and the liver. Clin.Biochem. 9, 149-152, 1976.

Glycocholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	22,50	32,83	12,91	29,61	26,22	25,43
s	21,36	17,91	16,74	13,62	18,03	18,55
$\bar{s}$	7,55	4,97	5,92	4,81	3,35	3,05
$\bar{x}+\bar{s}$	30,06	37,30	18,83	34,43	29,57	28,48
$\bar{x}-\bar{s}$	14,96	27,36	6,99	24,80	22,87	22,38
n	8	13	9	8	30	38

Glycoursodesoxycholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D
$\bar{x}$	1,49	8,98	8,76	6,95	8,36
s	2,88	12,75	12,18	12,86	12,20
$\bar{s}$	1,02	3,54	4,30	4,55	2,27
$\bar{x}+\bar{s}$	2,50	12,51	13,07	11,50	10,62
$\bar{x}-\bar{s}$	0,47	5,44	4,46	2,40	6,09
n	8	13	9	8	30

Glycochenodesoxycholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	37,81	28,31	44,50	33,28	34,15	34,94
s	18,52	10,10	22,39	11,96	15,86	16,27
$\bar{s}$	6,55	2,80	7,92	4,23	2,94	2,67
$\bar{x}+\bar{s}$	44,35	31,10	52,42	37,50	37,09	37,61
$\bar{x}-\bar{s}$	31,26	25,51	36,58	29,05	31,20	32,26
n	8	13	9	8	30	38

Glycodesoxycholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	17,44	20,34	17,64	23,60	20,49	19,83
s	18,08	12,38	11,22	17,03	13,22	14,18
$\bar{s}$	6,39	3,43	3,97	6,02	2,46	2,33
$\bar{x}+\bar{s}$	23,83	23,77	21,60	29,62	22,94	22,16
$\bar{x}-\bar{s}$	11,05	16,99	13,67	17,58	18,04	17,50
n	8	13	9	8	30	38

Tab. 1: Relative Häufigkeit (in Relativ-Prozenten) der obengenannten Sulfatester an der Summe aller Glycin-konjugierten Gallensäurensulfatester.
Gruppenmittelwert $\bar{x}$, Standardabweichung s, Standardfehler $\bar{s} = s/\sqrt{n}$, Anzahl der Patienten n.
A - Säuglinge, B - Klein-, C - Vorschul-, D - Schulkinder, Ko - Kontrollgruppe aus allen Gruppen gesunder Kinder (A-D), B-D - Kontrollgruppe ohne Säuglinge.
G-UD-S ohne Ko, da A sich signifikant unterscheidet v.B-D.

Glycolithocholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	20,73	10,05	15,93	7,55	10,98	13,09
s	26,66	7,00	13,76	7,84	9,72	15,10
$\bar{s}$	9,42	1,94	4,87	2,77	1,80	2,48
$\bar{x}+\bar{s}$	30,15	11,99	20,79	10,32	12,79	15,57
$\bar{x}-\bar{s}$	11,30	8,11	11,06	4,78	9,18	10,60
n	8	13	9	8	30	38

Anteil der Glycin-konj.GS-Sulfate an allen G-konj.GS

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	7,56	6,49	4,79	7,21	6,22	6,51
s	7,60	6,85	3,70	11,09	7,43	7,38
$\bar{s}$	2,69	1,90	1,31	3,92	1,38	1,21
$\bar{x}+\bar{s}$	10,25	8,39	6,10	11,13	7,60	7,72
$\bar{x}-\bar{s}$	4,88	4,59	3,48	3,29	4,84	5,30
n	8	13	9	8	30	38

Anteil der Glycin-konj.GS-Sulfate an den Gesamt-GS-Sulfaten

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	39,04	47,93	45,34	37,69	44,39	43,23
s	12,14	14,76	21,52	19,88	18,08	16,96
$\bar{s}$	4,29	4,09	7,61	7,03	3,36	2,79
$\bar{x}+\bar{s}$	43,34	52,02	52,95	44,72	47,74	46,02
$\bar{x}-\bar{s}$	34,75	43,83	37,73	30,66	41,03	40,44
n	8	13	9	8	30	38

Glycin-konj.GS-Sulfate / Taurin-konj.GS-Sulfate

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	1,81	2,17	1,99	2,14	2,11	2,04
s	1,05	1,16	2,05	2,79	1,91	1,75
$\bar{s}$	0,37	0,34	0,73	0,98	0,36	0,29
$\bar{x}+\bar{s}$	2,18	2,50	2,72	3,13	2,47	2,34
$\bar{x}-\bar{s}$	1,44	1,83	1,27	1,16	1,75	1,75
n	8	13	9	8	30	38

Tab. 2: Mittlere relative Häufigkeit $\bar{x}$ mit Standardabweichung s und Standardfehler $\bar{s}$, Anzahl der Patienten n,
oben des G-LC-S an den gesamten G-konj.GS-Sulfaten,
2.v.o. der G-konj.GS-S an allen Glycin-konj.Gallensäuren,
3.v.o. der G-konj.GS-S an den gesamten GS-Sulfaten,
unten des Quotienten der Glycin- zu Taurin-konj.GS-S.
A - Säuglinge, B - Klein-, C - Vorschul-, D - Schulkinder, Ko - Kontrollgruppe aus allen gen. Gruppen gesunder Kinder, B-D - Kontrollgruppe ohne Säuglinge.

Taurocholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	5,73	3,78	6,44	6,39	5,40	5,40
s	6,63	6,36	6,99	10,39	7,60	7,34
$\bar{s}$	2,35	1,76	2,33	3,67	1,39	1,19
$\bar{x}+\bar{s}$	8,07	5,55	8,77	10,06	6,79	6,59
$\bar{x}-\bar{s}$	3,35	2,02	4,11	2,72	4,02	4,21
n	8	13	9	8	30	38

Tauroursodesoxycholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	4,75	2,11	5,47	1,13	2,85	3,25
s	5,51	5,10	13,08	2,15	7,89	7,42
$\bar{s}$	1,95	1,42	4,39	0,76	1,44	1,20
$\bar{x}+\bar{s}$	6,70	3,52	9,83	1,89	4,29	4,46
$\bar{x}-\bar{s}$	2,80	0,69	1,11	0,36	1,41	2,05
n	8	13	9	8	30	38

Taurochenodesoxycholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	50,40	58,78	57,44	42,71	54,03	53,18
s	20,11	22,67	18,71	21,39	21,63	21,20
$\bar{s}$	7,11	6,29	6,24	7,56	3,95	3,44
$\bar{x}+\bar{s}$	57,51	65,07	63,68	50,27	58,04	56,62
$\bar{x}-\bar{s}$	43,29	52,49	51,20	35,15	50,14	49,74
n	8	13	9	8	30	38

Taurodesoxycholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D
$\bar{x}$	6,25	13,32	10,71	17,38	13,51
s	4,13	9,93	9,44	12,57	10,46
$\bar{s}$	1,46	2,75	3,15	4,44	1,91
$\bar{x}+\bar{s}$	7,71	16,07	13,86	21,82	15,42
$\bar{x}-\bar{s}$	4,79	10,56	7,56	12,93	11,60
n	8	13	9	8	30

Tab. 3: Mittlere relative Häufigkeit $\bar{x}$ der obengenannten Sulfatester in Relativ-Prozenten der Summe aller Taurin-konjugierten Sulfatester der jeweiligen Probe. Standardabweichung s, Standardfehler $\bar{s} = s/\sqrt{n}$, Anzahl der Patienten n, A - Säuglinge, B - Klein-, C - Vorschul-, D - Schulkinder, Ko - Kontrollgruppe aus den Gruppen A-D gesunder Kinder, B-D - Ko ohne A.
T-DC-S ohne Ko, da signifikanter Unterschied zw. A u. B-D.

Taurolithocholsäure-Sulfatester

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	32,87	21,90	19,93	32,79	24,21	25,45
s	24,91	22,69	22,66	33,52	25,58	25,70
$\bar{s}$	8,81	6,29	7,55	11,85	4,67	4,17
$\bar{x}+\bar{s}$	41,68	28,19	27,49	44,64	28,88	29,62
$\bar{x}-\bar{s}$	24,06	15,60	12,38	20,94	19,54	21,28
n	8	13	9	8	30	38

Anteil der T-GS-Sulfate an allen Taurin konj.Gallensäuren

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	7,01	4,93	6,84	4,21	5,31	5,66
s	6,03	4,74	8,25	3,15	5,62	5,67
$\bar{s}$	2,13	1,31	2,75	1,11	1,03	0,92
$\bar{x}+\bar{s}$	9,14	6,25	9,59	5,32	6,34	6,58
$\bar{x}-\bar{s}$	4,87	3,62	4,09	3,10	4,29	4,74
n	8	13	9	8	30	38

Anteil der T-GS-Sulfate an den Gesamt-GS-Sulfaten

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	25,93	23,86	32,80	32,18	28,77	28,18
s	11,24	10,75	14,66	17,20	14,04	13,40
$\bar{s}$	3,97	2,98	4,89	6,08	2,56	2,17
$\bar{x}+\bar{s}$	29,90	26,84	37,69	38,26	31,34	30,35
$\bar{x}-\bar{s}$	21,96	20,88	27,91	26,09	26,21	26,01
n	8	13	9	8	30	38

Anteil der GS-Sulfate an den Gesamt-Gallensäuren

	A	B	C	D	B-D	Ko
$\bar{x}$	10,38	6,40	6,58	8,28	6,96	7,68
s	7,81	5,15	5,05	9,52	6,37	6,73
$\bar{s}$	2,76	1,43	1,68	3,37	1,16	1,09
$\bar{x}+\bar{s}$	13,14	7,83	8,26	11,64	8,12	8,77
$\bar{x}-\bar{s}$	7,61	4,98	4,89	4,91	5,79	6,58
n	8	13	9	8	30	38

Tab. 4: Mittlere rel.Häufigkeit $\bar{x}$(in Rel.%) mit Standardabweichung s, Standardfehler $\bar{s}$, Anzahl der Patienten n,
oben des T-LC-S an den gesamten T-konj.GS-Sulfaten,
2.v.o. der T-GS-S an allen Taurin-konj.Gallensäuren,
3.v.o. der T-GS-S an den gesamten GS-Sulfaten,
unten der GS-Sulfate an allen Gallensäuren einer Probe.
A - Säuglinge, B - Klein-, C - Vorschul-, D - Schulkinder, Ko - Kontrollgruppe aus den Gruppen A-D gesunder Kinder, B-D - Ko ohne Säuglinge.

	G-CS-S		G-UD-S Säuglinge(<1a)		G-UD-S (>1a)		G-CDC-S		G-DC-S	
	Ko	Coe	A	Coe	B-D	Coe	Ko	Coe	Ko	Coe
$\bar{x}$	25,43	22,07	1,49	15,30	8,36	1,34	34,94	37,72	19,83	21,10
s	18,55	18,39	2,88	x_1= 6,50	12,20	3,78	16,27	21,30	14,18	21,13
$\bar{s}$	3,05	5,82	1,02	x_2=24,10	2,27	1,34	2,67	6,73	2,33	6,68
$\bar{x}+\bar{s}$	28,48	27,89	2,50		10,62	2,68	37,61	44,45	22,16	27,78
$\bar{x}-\bar{s}$	22,38	16,25	0,47		6,09	0,00	32,26	30,99	17,50	14,42
n	38	11	8	2	30	9	38	11	38	11
p	>0,05		>0,05		<0,02		>0,05		>0,05	

	G-LC-S		G-GS-S i.Rel-% d.G-konj.GS		G-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		$\frac{\text{G-GS-S}}{\text{T-GS-S}}$	
	Ko	Coe	Ko	Coe	Ko	Coe	Ko	Coe
$\bar{x}$	13,09	14,98	6,51	3,42	43,23	36,68	2,04	1,26
s	15,10	22,78	7,38	4,71	16,96	16,16	1,75	1,10
$\bar{s}$	2,48	7,20	1,21	1,49	2,79	5,10	0,29	0,33
$\bar{x}+\bar{s}$	15,57	22,18	7,72	4,91	46,02	41,78	2,34	1,59
$\bar{x}-\bar{s}$	10,60	7,78	5,30	1,93	40,44	31,58	1,75	0,93
n	38	11	38	11	38	11	38	11
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

Tab. 5: Untersuchungsergebnisse im Vergleich der Kinder mit Coeliakie (Coe) mit gesunden Kindern [Kontrollgruppe Ko, Säuglinge A, ältere Kinder (>1a) B-D] . Angaben der mittleren rel.Häufigkeit $\bar{x}$ in Rel.-%, der Standardabweichung s, dem Standardfehler $\bar{s}$= s $/\sqrt{n}$. oben und unten links : $\bar{x}$ der og.G-konj.GS-S an allen Glycin-konj.GS-Sulfaten, unten : 2.v.links - $\bar{x}$ der G-GS-Sulfate an allen Glycin-konj.Gallensäuren; 3.v.l. - $\bar{x}$ der Glycin-konj.GS-Sulfate an allen GS-Sulfaten; rechts - Quotient aus Glycin- zu Taurin-konj.GS-Sulfatestern.

	T-CS-S		T-UD-S		T-CDC-S		T-DC-S Säuglinge(<1a)		T-DC-S (>1a)	
	Ko	Coe	Ko	Coe	Ko	Coe	A	Coe	B-D	Coe
$\bar{x}$	5,40	6,17	3,25	6,77	53,18	53,05	6,25	11,95	13,52	11,42
s	7,34	11,56	7,42	15,67	21,20	22,32	4,13	x_1=21,90	10,47	9,03
$\bar{s}$	1,19	3,49	1,20	4,73	3,44	6,73	1,46	x_2= 2,00	1,91	3,01
$\bar{x}+\bar{s}$	6,59	9,66	4,46	11,50	56,62	59,78	7,71		15,43	14,43
$\bar{x}-\bar{s}$	4,21	2,69	2,05	2,05	49,74	46,31	4,79		11,60	8,41
n	38	11	38	11	38	11	8	2	30	9
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

	T-LC-S		T-GS-S i.Rel-% d.T-konj.GS		T-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		Sulfat-Anteil a.d.Gesamt-GS	
	Ko	Coe	Ko	Coe	Ko	Coe	Ko	Coe
$\bar{x}$	25,45	22,48	5,66	6,11	28,18	42,74	7,68	5,41
s	25,70	27,01	5,67	8,87	13,40	21,59	6,73	7,75
$\bar{s}$	4,17	8,14	0,92	2,67	2,17	6,51	1.09	2,34
$\bar{x}+\bar{s}$	29,62	30,64	6,58	8,78	30,35	49,25	8,77	7,74
$\bar{x}-\bar{s}$	21,28	14,35	4,74	3,44	26,01	36,23	6,58	3,07
n	38	11	38	11	38	11	38	11
p	>0,05		>0,05		<0,05		>0,05	

Tab. 6: Untersuchungsergebnisse im Vergleich der Kinder mit Coeliakie (Coe) mit gesunden Kindern [Kontrollgruppe Ko, Säuglinge A und ältere Kinder (>1a) B-D] . Angaben der mittleren rel.Häufigkeit $\bar{x}$ in Rel.-%, der Standardabweichung s und dem Standardfehler $\bar{s}= s/\sqrt{n}$.
oben u.unten links: $\bar{x}$ der og.Taurin-konj.GS-S an allen T-konj.GS-Sulfatestern,
unten: 2.v.links - $\bar{x}$ der T-GS-Sulfate an allen T-konj.Gallensäuren; 3.v.l. - $\bar{x}$ der Taurin-konj.GS-Sulfate an allen GS-Sulfatestern; rechts - $\bar{x}$ der Sulfatester an allen Gallensäuren einer Probe.

	G-CS-S		G-UD-S Säuglinge(<1a)		G-UD-S (>1a)		G-CDC-S		G-DC-S	
	Ko	KD	A	KD	B-D	KD	Ko	KD	Ko	KD
$\bar{x}$	25,43	8,45	1,49	9,34	8,36	16,40	34,94	43,70	19,83	28,05
s	18,55	9,01	2,88	x_1=0,00	12,20	x_1=0,00	16,27	13,46	14,18	16,95
$\bar{s}$	3,05	4,50	1,02	x_2=0,00	2,27	x_2=32,80	2,67	6,73	2,33	8,47
$\bar{x}+\bar{s}$	28,48	12,95	2,50	x_3=28,10	10,62		37,61	50,42	22,16	36,52
$\bar{x}-\bar{s}$	22,38	3,94	0,47		6,09		32,26	36,97	17,50	19,58
n	38	4	8	3	30	2	38	4	38	4
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

	G-LC-S		G-GS-S i.Rel-% d.G-konj.GS		G-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		$\frac{\text{G-GS-S}}{\text{T-GS-S}}$	
	Ko	KD	Ko	KD	Ko	KD	Ko	KD
$\bar{x}$	13,09	7,30	6,51	2,98	43,23	31,43	2,04	1,24
s	15,10	4,82	7,38	2,05	16,96	6,20	1,75	0,64
$\bar{s}$	2,48	2,41	1,21	1.03	2,79	3,10	0,29	0,32
$\bar{x}+\bar{s}$	15,57	9,71	7,72	4,00	46,02	34,53	2,34	1,56
$\bar{x}-\bar{s}$	10,60	4,89	5,30	1,95	40,44	28,33	1,75	0,92
n	38	4	38	4	38	4	38	4
p	>0,05		<0,05		>0,05		>0,05	

Tab. 7: Untersuchungsergebnisse im Vergleich : Kinder mit "Kurzdarm-Syndrom"(KD) - gesunde Kinder [Kontrollgruppe Ko, Säuglinge A und ältere Kinder (>1a) B-D]. Angaben der mittleren relativen Häufigkeit x in Rel.-%, der Standardabweichung s, des Standardfehlers $\bar{s} = s/\sqrt{n}$.
oben u.unten links : $\bar{x}$ der og. Glycin-konj.GS-S an allen G-konj.GS-Sulfatestern,
unten : 2.v.links - $\bar{x}$ der G-GS-Sulfate an allen G-konj.Gallensäuren; 3.v.l. - der Glycin-konj.GS-Sulfate an allen GS-Sulfatestern; rechts - Quotient aus Glycin- zu Taurin-konj.GS-Sulfatestern.

	T-CS-S		T-UD-S		T-CDC-S		T-DC-S Säuglinge(<1a)		T-DC-S (>1a)	
	Ko	KD	Ko	KD	Ko	KD	A	KD	B-D	KD
$\bar{x}$	5,40	8,84	3,25	7,67	53,18	54,33	6,25	1,40	13,52	21,38
s	7,34	7,48	7,42	3,62	21,20	10,13	4,13	x_1=0,00	10,47	x_1=15,40
$\bar{s}$	1,19	3,74	1,20	1,81	3,44	5,06	1,46	x_2=0,00	1,91	x_2=27,35
$\bar{x}+\bar{s}$	6,59	12,58	4,46	9,48	56,62	59,39	7,71	x_3=4,20	15,43	
$\bar{x}-\bar{s}$	4,21	5,10	2,05	5,86	49,74	49,26	4,79		11,60	
n	38	4	38	4	38	4	8	3	30	2
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

	T-LC-S		T-GS-S i.Rel-% d.T-konj.GS		T-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		Sulfat-Anteil a.d.Gesamt-GS	
	Ko	KD	Ko	KD	Ko	KD	Ko	KD
$\bar{x}$	25,45	19,70	5,66	9,08	28,18	35,72	7,68	6,58
s	25,70	11,20	5,67	3,60	13,40	15,67	6,73	3,87
$\bar{s}$	4,17	5,96	0,92	1,80	2,17	7,83	1,09	1,95
$\bar{x}+\bar{s}$	29,62	25,66	6,58	10,87	30,35	43,55	8,77	8,52
$\bar{x}-\bar{s}$	21,28	13,73	4,74	7,28	26,01	27,88	6,58	4,65
n	38	4	38	4	38	4	38	4
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

Tab. 8: Untersuchungsergebnisse im Vergleich : Kinder mit "Kurzdarm-Syndrom"(KD) - gesunde Kinder [Kontrollgruppe Ko,bzw. Säuglinge A und ältere Kinder (>1a) B-D]. Angaben der mittleren rel.Häufigkeit $\bar{x}$ in Rel.-%, der Standardabweichung s,des Standardfehlers $\bar{s}$= $= s/\sqrt{n}$.
oben und unten links:mittl.rel.H. der gen.T-GS-S an den gesamten Taurin-konj.GS-Sulfaten, unten: 2.v.links - der Taurosulfate an allen T-konj.Gallensäuren; 3.v.l. - der Taurosulfate an allen Sulfatestern; rechts - der Sulfatester an allen Gallensäuren der Probe.

	G-CS-S		G-UD-S Säuglinge(<1a)		G-UD-S (>1a)		G-CDC-S		G-DC-S	
	Ko	CF	A	CF	B-D	CF	Ko	CF	Ko	CF
$\bar{x}$	25,43	25,40	1,49	x_1=33,0	8,36	0,67	34,94	28,62	19,83	27,05
s	18,55	17,82	2,88		12,20	1,63	16,27	6,58	14,18	19,69
$\bar{s}$	3,05	6,74	1,02		2,27	0,67	2,67	2,49	2,33	7,44
$\bar{x}+\bar{s}$	28,48	32,14	2,50		10,62	1,34	37,61	31,11	22,16	34,49
$\bar{x}-\bar{s}$	22,38	18,66	0,47		6,09	0,00	32,26	26,14	17,50	19,61
n	38	7	8	1	30	6	38	7	38	7
p	>0,05		>0,05		<0,01		>0,05		>0,05	

	G-LC-S		G-GS-S i.Rel-% d.G-konj.GS		G-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		$\frac{\text{G-GS-S}}{\text{T-GS-S}}$	
	Ko	CF	Ko	CF	Ko	CF	Ko	CF
$\bar{x}$	13,09	13,69	6,51	4,81	43,23	34,22	2,04	1,19
s	15,10	11,34	7,38	4,81	16,96	15,43	1,75	0,83
$\bar{s}$	2,48	4,29	1,21	1,82	2,79	5,83	0,29	0,31
$\bar{x}+\bar{s}$	15,57	17,97	7,72	6,62	46,02	40,05	2,34	1,51
$\bar{x}-\bar{s}$	10,60	9,40	5,30	2,99	40,44	28,39	1,75	0,88
n	38	7	38	7	38	7	38	7
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

Tab. 9: Untersuchungsergebnisse mit Angabe der mittleren rel.Häufigkeit $\bar{x}$ in Rel.-% bei Kindern mit Mukoviszidose (CF) im Vergleich zur Kontrollgruppe gesunder Kinder [Ko, bzw. bei Kindern <1a : A; bei Kindern >1a : B-D] .Häufigkeit der einzelnen G-GS-S an den gesamten Glycin-konj.GS-Sulfaten.(oben u.unten links).
Untere Reihe: 2.von links - der Glycinsulfate an allen G-konj.Gallensäuren, 3.von links -der Glycinsulfate an den Gesamtsulfaten, rechts - Quotient aus Glycin- zu Taurin konj.GS-Sulfaten.

	T-CS-S		T-UD-S		T-CDC-S		T-DC-S Säuglinge(<1a)		T-DC-S (>1a)	
	Ko	CF	Ko	CF	Ko	CF	A	CF	B-D	CF
$\bar{x}$	5,40	16,31	3,25	10,14	53,18	42,51	6,25	x_1=0	13,52	14,75
s	7,34	20,39	7,42	15,12	21,20	24,75	4,13		10,47	14,40
$\bar{s}$	1,19	7,71	1,20	5,71	3,44	9,35	1,46		1,91	5,88
$\bar{x}+\bar{s}$	6,59	24,01	4,46	15,86	56,62	51,87	7,71		15,43	20,63
$\bar{x}-\bar{s}$	4,21	8,60	2,05	4,43	49,74	33,16	4,79		11,60	8,87
n	38	7	38	7	38	7	8	1	30	6
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

	T-LC-S		T-GS-S i.Rel-% d.T-konj.GS		T-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		Sulfat-Anteil a.d.Gesamt-GS	
	Ko	CF	Ko	CF	Ko	CF	Ko	CF
$\bar{x}$	25,45	18,42	5,66	16,56	28,18	37,01	7,68	10,93
s	25,70	30,80	5,67	12,79	13,40	13,46	6,73	8,64
$\bar{s}$	4,17	11,64	0,92	4,83	2,17	5,09	1,09	3,27
$\bar{x}+\bar{s}$	29,62	30,06	6,58	21,39	30,35	42,10	8,77	14,19
$\bar{x}-\bar{s}$	21,28	6,78	4,74	11,72	26,01	31,92	6,58	7,66
n	38	7	38	7	38	7	38	7
p	>0,05		>0,05		<0,05		>0,05	

Tab.10: Kinder mit Mucoviscidose (CF); Untersuchungsergebnisse verglichen mit den jeweiligen Ergebnissen der Kontrollgruppe (Ko bzw. A und B-D). Mittlere relative Häufigkeit $\bar{x}$ der og.T-GS-S an den gesamten T-konj.GS-S(bzw. unten 2.v.links: der Taurosulfate an allen T-konj.Gallensäuren, u.3.v.links: der Taurosulfate an den Gesamtsulfaten, unten rechts: derSulfatester an allen Gallensäuren der Probe.

	G-CS-S		G-UD-S Säuglinge(<1a)		G-UD-S (>1a)		G-CDC-S		G-DC-S	
	Ko	EPI	A	EPI	B-D	EPI	Ko	EPI	Ko	EPI
$\bar{x}$	25,43	16,40	1,49	21,33	8,36	13,43	34,94	23,97	19,83	23,80
s	18,55	20,82	2,88	26,31	12,20	16,97	16,27	14,23	14,18	24,90
$\bar{s}$	3,05	7,36	1,02	13,16	2,27	8,48	2,67	5,03	2,33	8,82
$\bar{x}+\bar{s}$	28,48	23,76	2,50	34,49	10,62	21,91	37,61	29,00	22,16	32,62
$\bar{x}-\bar{s}$	22,38	9,04	0,47	8,17	6,09	4,95	32,26	18,94	17,50	14,98
n	38	8	8	4	30	4	38	8	38	8
p	< 0,05		< 0,05		< 0,05		< 0,05		< 0,05	

	G-LC-S		G-GS-S i.Rel-% d.G-konj.GS		G-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		$\frac{\text{G-GS-S}}{\text{T-GS-S}}$	
	Ko	EPI	Ko	EPI	Ko	EPI	Ko	EPI
$\bar{x}$	13,09	18,44	6,51	8,80	43,23	39,74	2,04	1,98
s	15,10	13,48	7,38	14,57	16,96	17,86	1,75	1,04
$\bar{s}$	2,48	4,77	1,21	5,15	2,79	6,31	0,29	0,37
$\bar{x}+\bar{s}$	15,57	23,20	7,72	13,95	46,02	46,05	2,34	2,35
$\bar{x}-\bar{s}$	10,60	13,67	5,30	3,65	40,44	33,42	1,75	1,61
n	38	8	38	88	38	8	38	8
p	<0,05		<0,05		<0,05		<0,05	

Tab.11: Untersuchungsergebnisse - Vergleich der Kinder mit exokriner Pankreasinsuffizienz ohne Mucoviszidose (EPI) mit den gesunden Kindern [Kontrollgruppe Ko, Säuglinge A, ältere Kinder (>1a) B-D] .
oben u.unten links : $\bar{x}$ der og.Glycin-konj.GS-S an allen G-konj.GS-Sulfaten,
unten : 2.v.links $\bar{x}$ der G-GS-Sulfate an allen G-konj.Gallensäuren; 3.v.l. - $\bar{x}$ der Glycin-konj.GS-Sulfate an allen GS-Sulfaten; rechts - $\bar{x}$ des Quotienten aus Glycin- zu Taurin- kojugierten GS-Sulfatestern.

	T-CS-S		T-UD-S		T-CDC-S		T-DC-S Säuglinge(<1a)		T-DC-S (>1a)	
	Ko	EPI	Ko	EPI	Ko	EPI	A	EPI	B-D	EPI
$\bar{x}$	5,40	5,03	3,25	4,41	53,18	58,83	6,25	1,58	13,52	6,23
s	7,34	5,06	7,42	8,93	21,20	35,86	4,13	1,86	10,47	7,21
$\bar{s}$	1,19	1,79	1,20	3,16	3,44	12,68	1,46	0,93	1,91	3,61
$\bar{x}+\bar{s}$	6,59	6,82	4,46	7,57	56,62	71,55	7,71	2,51	15,43	9,84
$\bar{x}-\bar{s}$	4,21	3,26	2,05	1,25	49,74	46,20	4,79	0,65	11,60	2,62
n	38	8	38	8	38	8	8	4	30	4
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

	T-LC-S		T-GS-S i.Rel-% d.T-konj.GS		T-GS-S i.Rel-% d.Gesamt-S		Sulfat-Anteil a.d.Gesamt-GS	
	Ko	EPI	Ko	EPI	Ko	EPI	Ko	EPI
$\bar{x}$	25,45	27,76	5,66	15,91	28,18	34,66	7,68	13,33
s	25,70	31,86	5,67	19,66	13,40	14,60	6,73	18,32
$\bar{s}$	4,17	11,27	0,92	6,95	2,17	5,16	1,09	6,48
$\bar{x}+\bar{s}$	29,62	39,03	6,58	22,86	30,35	39,83	8,77	19,80
$\bar{x}-\bar{s}$	21,28	16,50	4,74	8,96	26,01	29,50	6,58	6,85
n	38	8	38	8	38	8	38	8
p	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	

Tab. 12: Untersuchungsergebnisse im Vergleich : Kinder mit exokriner Pankreasinsuffizienz ohne Mukoviszidose (EPI) - gesunde Kinder [Kontrollgruppe Ko, Säuglinge A, ältere Kinder (>1a) B-D].
oben und unten links: $\bar{x}$ der og.Taurin-konj.GS-Sulfate an allen T-konj.GS-Sulfaten, unten : 2.v.links - $\bar{x}$ der T-GS-Sulfatester an allen T-konj.Gallensäuren; 3.v.l. - $\bar{x}$ der der T-GS-S an allen GS-Sulfaten; rechts - $\bar{x}$ der Sulfatester an allen Gallensäuren einer Probe.

Lebenslauf

Am 30. Oktober 1951 wurde ich, Joachim Hans-Dirk Weishorn, als Sohn des Apothekers Johannes Weishorn und seiner Ehefrau, Charlotte Weishorn, geb. Hentzschel, in Naunhof bei Leipzig geboren.

Nach Besuch von Grundschule und Gymnasium beendete ich meine Schulausbildung am 14. Juni 1971 mit dem Abitur am Albert-Schweitzer-Gymnasium in Leonberg.
Im Wintersemester 1971/72 begann ich das Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Gleichzeitig nahm ich an einem einjährigen Studium Fundamentale im damaligen Leibniz-Kolleg der Universität teil.
Am 7. Mai 1979 bestand ich die Ärztliche Prüfung.
1979 und 1980 war ich Assistent an der Universitäts-Hautklinik Tübingen. Seit 1981 arbeite ich als Assistenzarzt an der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Böblingen.